

Aus der Klinik für Neurologie  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Lars Timmermann  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

# **Das *PLA2G6* Gen bei Parkinson Patienten mit frühem Krankheitsbeginn**

Inaugural – Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin  
dem Fachbereich Medizin  
der Philipps-Universität Marburg vorgelegt

---

von  
Kai Michael Kauther  
aus Wuppertal

Marburg, 2021

Angenommen vom Fachbereich Medizin  
der Philipps-Universität Marburg (Hochschulkennziffer: 1180)  
am: 30.06.2021

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan:	Frau Prof. Dr. D. Hilfiger-Kleiner
Referent:	Herr Prof. Dr. Jens Carsten Möller
1. Korreferent:	Herr Prof. Dr. Johannes Schumacher
2. Korreferent:	Herr Prof. Dr. Niels Decher



## Inhaltsverzeichnis

<b>I. Abkürzungs-, Abbildungs- und Tabellenverzeichnisse .....</b>	<b>6</b>
<b>I.I Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>6</b>
<b>I.II Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>8</b>
<b>I.III Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>8</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>9</b>
<b>1.1 Die Parkinson-Krankheit .....</b>	<b>9</b>
<b>1.2 Definition .....</b>	<b>9</b>
<b>1.3 Klassifikation .....</b>	<b>9</b>
<b>1.4 Epidemiologie .....</b>	<b>11</b>
<b>1.5 Klinik.....</b>	<b>12</b>
1.5.1 Kardinalsymptome .....	12
1.5.2 Begleitsymptome .....	13
1.5.3 Die klinische Ausprägung beim EOPD .....	13
<b>1.6 Diagnose .....</b>	<b>14</b>
<b>1.7 Neuropathologie beim Parkinson – Syndrom .....</b>	<b>16</b>
<b>1.8 Ätiologie .....</b>	<b>18</b>
1.8.1 Inflammation.....	20
1.8.2 Oxidativer Stress .....	20
1.8.3 Protein-Aggregation .....	21
1.8.4 Gestörter Eisenmetabolismus .....	22
<b>1.9 Die Genetik beim EOPD.....</b>	<b>23</b>
1.9.1 $\alpha$ -Synuclein Gen, PARK1, PARK4.....	24
1.9.2 Parkin Gen, PARK2 .....	25
1.9.3 PINK1 Gen, PARK6.....	25
1.9.4 DJ-1 Gen, PARK7 .....	26
1.9.5 LRRK2 Gen, PARK8.....	27
1.9.6 ATP13A2, PARK9 .....	27
1.9.7 FBXO7 Gen; PARK15 .....	28
1.9.8 DNAJC6 Gen; PARK 19.....	28
1.9.9 Synj1 Gen; PARK20.....	29
<b>1.10 PLA2G6 Gen; PARK 14 .....</b>	<b>29</b>
<b>1.11 Zielsetzung dieser Studie.....</b>	<b>32</b>
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>33</b>
<b>2.1 Probandenkollektive.....</b>	<b>33</b>
2.1.1 Patienten-Kontroll-Gruppe 1 .....	33
2.1.2 Patienten-Kontroll-Gruppe 2 .....	34
<b>2.2 Verwendete Materialien.....</b>	<b>35</b>
2.2.1 Lösungen und Puffer.....	35
2.2.2 Gele und DNA-Leiter .....	36
2.2.3. PCR .....	36
2.2.4. Sequencing.....	36
2.2.5 Primer .....	37
<b>2.3 Methoden.....</b>	<b>38</b>
2.3.1 Präparation der genomischen DNA .....	38
2.3.2 Standard-PCR.....	39
2.3.3 Gel-Elektrophorese .....	40
2.3.4 Aufbereitung der PCR-Produkte.....	40

2.3.5 Sequenzierung.....	42
2.3.6 Auswertung und Benennung der Polymorphismen .....	42
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>44</b>
<b>3.1 Patienten-Kontroll-Gruppe 1.....</b>	<b>44</b>
3.1.1 c.-130C>T Polymorphismus; rs11570597; Exon 1; 5'UTR .....	45
3.1.2 c.-20C>A Polymorphismus; Exon 2; 5'-UTR .....	46
3.1.3 c.87G>A Polymorphismus; rs2267369; Exon 2 .....	47
3.1.4 c.756C>T Polymorphismus; Exon 5 .....	48
3.1.5 c.957G>A Polymorphismus; rs11570679; Exon 7 .....	49
3.1.6 c.966C>T Polymorphismus; Exon 7 .....	49
3.1.7 c.1027G>A Polymorphismus; rs11570680; Exon 7 .....	50
3.1.8 c.1381C>T Polymorphismus; rs76718524; Exon 10 .....	51
3.1.9 c.2340C>T Polymorphismus; Exon 17 .....	52
3.1.10 c.2341G>A Polymorphismus, Exon 17 .....	53
<b>3.2 Patienten-Kontroll-Gruppe 2.....</b>	<b>53</b>
3.2.1 c.-20C>A Polymorphismus, Exon 2 .....	54
3.2.2 c.1381C>T Polymorphismus, Exon 10 .....	54
3.2.3 c.2340C>T Polymorphismus, Exon 17 .....	54
3.2.4 c.2341G>A Polymorphismus, Exon 17 .....	55
3.2.5 c.2339A>G Polymorphismus, Exon 17 .....	55
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>56</b>
4.1 Patienten und Kontrollpersonen .....	56
4.2 Material und Methoden .....	60
4.3 Ergebnisse .....	63
4.4 Vergleich mit aktuellen Studien .....	66
4.5 Die Rolle der Phospholipase A2 in der Neurodegeneration .....	68
4.6. Das PLA2G6 Gen als Suszeptibilitäts-gen .....	71
4.7 Fazit .....	72
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>74</b>
5.1 Deutsch.....	74
5.2 Englisch .....	76
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>78</b>
<b>7. Anhang .....</b>	<b>96</b>
7.1 Kriterien der UK Parkinson's Disease Society Brain Bank .....	96
7.2 Tabellarischer Lebenslauf .....	97
7.3 Verzeichnis der akademischen Lehrer.....	98
7.4 Danksagung .....	99
7.5 Ehrenwörtliche Erklärung.....	100

# I. Abkürzungs-, Abbildungs- und Tabellenverzeichnisse

## I.I Abkürzungsverzeichnis

ABI	Applied Biosystems
AaO	Age at Onset
AaS	Age at Sampling
AGEs	Advanced-Glycation-Endproducts
aINAD	Atypische infantile neuroaxonale Dystrophie
ATP13A2	ATPase 13A2 Gen (PARK9)
bp	Basenpaare
CT	Computertomographie
ddNTPs	Didesoxyribonukleotid-Triphosphate
DJ-1	Daisuke-Junko-1, Parkinsonism associated deglycase Gen( PARK7 )
DMT1	Divalenter Metall Transporter 1
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotid-Triphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIF-4G1	Eukaryotic Translation Initiation Factor 4-Gamma Gen ( PARK18 )
EOPD	Early-onset Parkinson's Disease
FBXO7	F-Box Protein 7 (Park15)
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
HLA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
INAD	Infantile neuroaxonale Dystrophie
IPD	Ideopathic Parkinson's Disease
iPLA2	Calcium unabhängige Phospholipase A2
iPLA2-VI	Calcium-independent phospholipase A2 Gruppe 6
KRS	Kufor-Rakeb Syndrom
LRRK2	Leucin-rich repeat kinase 2 ( PARK 8 )
MPTP	1-Methyl 4-phenyl 1,2,3,6-tetrahydropyridin
NINDS	National Institute of Neurological Disorders and Stroke
NO	Stickstoffmonoxid
IPS	Idiopathisches Parkinson Syndrom
MDS-UPDRS	Movement Disorder Society sponsored Unified Parkinsons Disease Rating Scale
MPP+	1-Methyl4-phenyl-pyridin

MPTP	1-Methyl 4-Phenyl 1,2,3,6-Tetrahydropyridin
MRT	Magnetresonanztomographie
NBIA	Neurodegeneration with brain-iron accumulation
NO	Stickstoffmonoxid
PANK2	Pantothenate Kinase 2
PARK 1-23	Mit der Parkinson-Erkrankung assoziierte Genorte in der Reihenfolge ihrer Beschreibung
PARK1	Gen: SNCA ( $\alpha$ -Synuclein Gen)
PARK2	Gen : PRKN (Parkin Gen)
PARK4	Gen : SNCA ( $\alpha$ -Synuclein Gen)
PARK6	Gen : PINK1
PARK7	Gen : DJ-1
PARK8	Gen : LRK2
PARK9	Gen : ATP13A2
PARK14	Gen : PLA2G6
PARK15	Gen : FBXO7
PARK19	Gen : DNAJC6
PARK20	Gen: SYNJ1
PARK21	Gen : DNAJC13
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Parkinson-Erkrankung
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PINK1	Phosphatase and tensin homolog-induced putative kinase 1 (PARK6)
PKAN	Panthothenate kinase-associated Neurodegeneration
PLAN	PLA2G6 assoziierte Neurodegeneration
PLA2G6	Phospholipase A2 Group 6 (PARK14 )
PRKN	Parkin Gen(PARK2)
RNS	Reactive nitrogen species
ROS	Reactive oxygen species
SNCA	$\alpha$ -Synuclein Gen
SNP	Single-nucleotide-polymorphismen
SPECT	Einzel-Photonen-Emissions-Computertomographie
Taq	Thermophilus aquaticus
TBE	Tris Boric EDTA
TRAP	Tremor, Rigor, Akinesie und Posturale Instabilität
UPS	Ubiquitin- Proteasom-System
UTR	Untranslated region
VLOPD	Very late-onset Parkinson's Disease
VPS35	Vacuolar protein sorting-associated protein 35 (PARK17)
YOPD	Young-onset Parkinson's Disease

## I.II Abbildungsverzeichnis

<u>Abb. 1:</u> Polymorphismus c.-130C>T; Exon 1; dbSNP-Nr. rs11570597; Patient 16209	46
<u>Abb. 2:</u> Polymorphismus c.-20C>A; Exon 2; Patient 13834	47
<u>Abb. 3:</u> Polymorphismus c.87G>A; Exon 2; dbSNP-Nr. rs2267369; Patient 19550	48
<u>Abb. 4:</u> Polymorphismus c.756C>T; Exon 5; Patient 19793	48
<u>Abb. 5:</u> Polymorphismus c.957G>A; Exon 7; dbSNP-Nr. rs11570679; Patient 15442	49
<u>Abb. 6:</u> Polymorphismus c.966C>T; Exon 7; Patient 14482	50
<u>Abb. 7:</u> Polymorphismus c.1027G>A; dbSNP-Nr. rs11570680; Exon 7; Patient 10878	51
<u>Abb. 8:</u> Polymorphismus c.1381C>T; Exon 10; dbSNP-Nr. rs76718524; Patient 14732	52
<u>Abb. 9:</u> Polymorphismus c.2340C>T; Exon 17; Patient 17120	52
<u>Abb. 10:</u> Polymorphismus c.2341G>A; Exon 17; Patient 15874	53
<u>Abb. 11:</u> Polymorphismus c.2339A>G; Exon 17; Patient 18959	55
<u>Abb. 12:</u> Ausgewählte Polymorphismen im PLA2G6 Gen	70

## I.III Tabellenverzeichnis

<u>Tabelle 1:</u> Demographische Daten der EOPD - und Kontrollgruppen	35
<u>Tabelle 2:</u> Polymorphismen im PLA2G6 Gen in der Patienten-Kontroll-Gruppe 1	45
<u>Tabelle 3:</u> Polymorphismen im PLA2G6 Gen in der Patienten-Kontroll-Gruppe 2	54



# 1. Einleitung

## 1.1 Die Parkinson-Krankheit

Die Parkinson-Krankheit wurde im Jahre 1817 erstmalig in der medizinischen Literatur ausführlich von James Parkinson (1755—1824) einem britischen Arzt, Apotheker und Paläontologen, beschrieben. Er nannte diese Erkrankung *shaking palsy* oder *paralysis agitans* und wies auf die langsame Progredienz dieser Erkrankung hin (Parkinson, 1817). Bereits ca. 1500 bis 1000 Jahre vor Christi Geburt wurde in der indischen Ayurveda der Morbus Parkinson als „Kampavarta“ (kamp = Zittern / Schütteln) beschrieben und mittels L-Dopamin haltigen Pflanzensamen behandelt. Ebenfalls in der römischen und griechischen Literatur wurde über Tremor-Erkrankungen berichtet (Thümler, 2002).

## 1.2 Definition

Die Parkinson-Krankheit ist eine progredient verlaufende, neurodegenerative Krankheit, deren Ursprung in dem Untergang der dopaminergen Neurone der Substantia nigra liegt. Hieraus resultiert in den übergeordneten Basalganglien ein Mangel an dem enthemmenden Neurotransmitter Dopamin. Das Krankheitsbild ist gekennzeichnet durch die Kardinalsymptome Akinese, Rigor, Ruhetremor und posturale Instabilität. Als Synonyme werden idiopathisches Parkinson-Syndrom (IPS), Morbus Parkinson, primäres Parkinson-Syndrom, Parkinson Erkrankung (PE) und Parkinson-Krankheit benutzt, wobei letztere die derzeit gebräuchlichste Bezeichnung ist (siehe 1.3 Klassifikation).

## 1.3 Klassifikation

Die Parkinson-Krankheit ist eine bemerkenswert variable Erkrankung. Diese Variabilität führte zu einer Reihe von Studien, die die Existenz von Untergruppen belegen sollten (van Rooden et al., 2011, Liu et al., 2011).

Die empirischen Klassifikationen basieren allein auf der klinischen Beobachtung der Heterogenität der Symptome.

Die andere Art der Klassifikation beruht auf Cluster Analyse Techniken aufgegliedert in Symptomatik und Verlauf mit bis zu achtzehn Variablen (Marras and Lang, 2013).

Während man international noch auf der Suche nach einer einheitlichen Klassifikation ist, hat sich die Deutsche Gesellschaft für Neurologie zu folgender Klassifikation entschlossen. Danach werden die Parkinson Syndrome in vier Gruppen unterteilt (Oertel W, 2012):

1. Idiopathisches Parkinson-Syndrom mit
  - akinetischem Typ
  - Äquivalenz-Typ
  - Tremordominanz-Typ
2. Genetische Formen des Parkinson-Syndroms mit den monogenetischen Formen (PARK 1—23)
3. Parkinson-Syndrome im Rahmen anderer neurodegenerativer Erkrankungen (atypische Parkinson-Syndrome)
4. Symptomatische (sekundäre) Parkinson-Syndrome.

Arbeiten, die sich mit einem frühen Beginn der Parkinson-Krankheit beschäftigen, unterscheiden je nach dem zeitlichen Auftreten der ersten Symptome verschiedene Patientengruppen. In der Literatur sind auch hier verschiedene Einteilungen zu finden. Vom frühesten bis zum spätesten Zeitpunkt der ersten Symptome sortiert, unterscheidet man das juvenile Parkinson-Syndrom (JPS), young-onset Parkinson-Syndrom (YOPD), late-onset Parkinson-Syndrom (LOPD) und very-late-onset Parkinson-Syndrom (VLOPD). Die beiden frühen Formen JPS und YOPD werden zusammen als das früh beginnende Parkinson-Syndrom (*engl. early-onset parkinson's disease* (EOPD)) zusammengefasst (Thümler, 2002, Schrag and Schott, 2006). Das Unterscheidungsmerkmal zwischen den jeweiligen Formen ist das Alter bei Beginn der Erkrankung (*engl. age at onset, AaO*), also beim Beginn der ersten

Symptome. Eine internationale und allgemeingültige Definition der Formen gibt es auch hier noch nicht. Das Alter, auf das sich die Einteilung stützt, variiert häufig. So wird in verschiedenen Veröffentlichungen das EOPD mit einem AaO von kleiner 40 Jahren oder kleiner als 55 Jahren angegeben (Schrag and Schott, 2006, Ylikotila et al., 2015, Quinn et al., 1987). In den meisten Fällen jedoch wird das EOPD mit einem AaO von  $\leq 50$  Jahren, JPD mit einem AaO  $\leq 21$  Jahren, LOPD mit einem AaO von  $\geq 60$  Jahren und VLOPD mit einem AaO  $\geq 75$  Jahren definiert (Fereshtehnejad et al., 2014, Macedo et al., 2009, Ferguson et al., 2016).

## 1.4 Epidemiologie

Morbus Parkinson ist nach der Alzheimer Erkrankung die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung in Deutschland, mit schätzungsweise 220.000 bis 250.000 Betroffenen in Deutschland und circa 1,25 Millionen in Europa (Gerlach, 2007, Gustavsson et al., 2011). Männer sind von der neurodegenerativen Erkrankung häufiger betroffen als Frauen. Das Geschlechterverhältnis wird von Wooten et al. in einer Metaanalyse (männlich zu weiblich), mit 1,49 : 1 angegeben (Wooten et al., 2004). Die Prävalenz der Parkinson-Krankheit steigt mit höherem Lebensalter an. Die Angaben zu Inzidenz und Prävalenz werden jedoch sehr unterschiedlich angegeben. Laut einer europäischen Multicenterstudie liegt die Inzidenz zwischen 5/100.000 pro Jahr und 346/100.000 pro Jahr. Die Prävalenz der Parkinson-Krankheit in den verschiedenen europäischen Ländern beträgt zwischen 65,6/100.000 und 12500/100.000 (von Campenhausen et al., 2005). Kleinhenz et al. berichteten über eine Prävalenz von ca. 185/100.000 in Schleswig-Holstein (Kleinhenz et al., 1990). Von allen Patienten mit dem Parkinson Syndrom weisen circa 3% bis 5% ein EOPD auf. In Japan beträgt der Anteil sogar bis zu 10% (Schrag and Schott, 2006, Ferguson et al., 2016). Aufgrund der großen Zeitspanne von theoretisch 0 bis 50 Jahren sind auch hier stark schwankende Angaben zu der Inzidenz zu finden. So liegt in den USA die jährliche Inzidenz des EOPD zwischen 0,8/100.000 im Alter bis 29 Jahren und 3,0/100.000 im Alter zwischen 30 und 49 Jahren (Schrag and Schott, 2006). In Finnland wurde die Inzidenz in den Jahren von 1995 bis 2006 mit durchschnittlich 3,3/100.000 pro Jahr

angegeben, wobei sie in diesem Zeitraum um den Faktor 1,7 gestiegen ist (Ylikotila et al., 2015).

## **1.5 Klinik**

Die Symptome des Parkinson-Syndroms kann man unterteilen in Kardinalsymptome, motorische Begleitsymptome und nicht-motorische Begleitsymptome (Becker et al., 2002).

### **1.5.1 Kardinalsymptome**

Die vier Kardinalsymptome sind Akinese, Ruhetremor, Rigor (Rigidität) und posturale Instabilität (*engl.: TRAP: Tremor at rest, rigidity, akinesia, postural instability*) (Jankovic, 2008).

Die Akinese beschreibt eine Bewegungsarmut, jedoch keine Lähmung im eigentlichen Sinne. Im fortgeschrittenen Stadium fällt es dem Patienten schwer, seine Motorik gezielt und kraftvoll einzusetzen. Auffällig ist hier häufig eine Hemmung der Initiation einer Bewegung (freezing) (Jankovic, 2008).

Der Tremor (lat. tremere = Zittern) ist eine unwillkürlich auftretende Zitterbewegung. Er entsteht durch rhythmische Kontraktionen der agonistischen und antagonistischen Muskulatur. Für die Parkinson-Krankheit kennzeichnend ist ein Ruhetremor mit einer Frequenz von 4—6 Hz, der bei Bewegung sistiert. Im Volksmund wird dieser vor allem den Daumen und Zeigefinger betreffende Tremor häufig als „Pillendreher“ (*Engl.: pill-rolling*) oder „Geldzähler“ bezeichnet (Weintraub et al., 2008).

Beim Rigor (lat. = Starre) handelt es sich um eine Steifigkeit der Gelenke durch einen erhöhten Muskeltonus der quergestreiften Muskulatur. In der körperlichen Untersuchung zeigt er sich durch eine „wächserne“ Starre und das „Zahnrad-Phänomen“ (*engl.: cogwheel phenomenon*) beim passiven Bewegen der Extremitäten (Weiner, 2006). Patienten fällt er meist nur durch Muskel- bzw. Gelenkschmerzen auf.

Die posturale Instabilität ist durch Gang- und Standunsicherheit gekennzeichnet. Sie kommt durch gestörte Stellreflexe zustande, woraus verzögerte Ausgleichsbewegungen resultieren. Es kommt hierdurch zu einer vermehrten Fallneigung.

Nach der Ausprägung und der Kombination der Kardinalsymptome kann man zwischen den drei verschiedenen Subtypen differenzieren.: Dem häufiger

vorkommenden akinetisch-rigiden Typ, dem tremordominanten Typ und dem Äquivalenz-Typ mit etwa gleich ausgeprägter Akinese bzw. Tremor (Poewe, 2008).

### **1.5.2 Begleitsymptome**

Neben den Kardinalsymptomen treten beim Morbus Parkinson viele Begleitsymptome auf. Diese werden in motorische und in nicht-motorische Symptome gegliedert. Motorische Begleitsymptome sind unter anderem eine Hypomimie, fehlende Mitschwingbewegungen der Extremitäten und Mikrographie. Mit den Kardinalsymptomen, sind die motorischen Symptome die deutlichsten Erscheinungen und meist wird die Krankheit erst bei ihrem Auftreten erkannt, obwohl sie schon weiter fortgeschritten ist. In späteren Stadien der Parkinson-Erkrankung treten auch Dysphagien mit Pseudohyposalivation und Festinationen auf.

Die nicht-motorischen Begleitsymptome kann man nochmals in vegetative, sensorische und psychische Symptome unterteilen (Gerlach, 2007, Jankovic, 2008, Poewe, 2008, Zibetti et al., 2007). Nach Poewe steigt die Prävalenz der nicht-motorischen Symptome während des Krankheitsverlaufes stark an. Viele von ihnen kommen jedoch auch schon vor dem Auftreten der motorischen Symptome vor. Als vegetative Symptome sind unter anderem orthostatische Dysfunktion, Miktionsbeschwerden, Obstipation, Libido- und Potenzverlust beschrieben. Bei den sensorischen Symptomen treten Geruchs- und Geschmackstörungen, Dysästhesien, Parästhesien und visuelle Störungen auf. An psychischen Symptomen sind Demenz, Depression, Lustlosigkeit, Teilnahmslosigkeit und Halluzinationen beschrieben (Poewe, 2008).

### **1.5.3 Die klinische Ausprägung beim EOPD**

Alle oben aufgeführten Kardinal- und Begleitsymptome werden auch bei Patienten mit EOPD beschrieben. Jedoch unterscheiden sich die Erstsymptome und auch der Verlauf der meisten EOPD-Patienten von den Patienten mit LOPD. Die Patienten mit EOPD zeigen im Vergleich zu den Patienten mit einem späten Ausbruch der Erkrankung eine langsamere Krankheitsprogression (Wickremaratchi et al., 2009, Ferguson et al., 2016). Bei den motorischen Symptomen liegt beim EOPD zu Beginn der Erkrankung oft eine Dystonie vor.

Im Gegensatz hierzu imponiert bei Patienten mit LOPD der Ruhetremor doppelt so häufig als Erstsymptom als beim EOPD (Wickremaratchi et al., 2011). Auch bei den nicht-motorischen Begleitsymptomen zeigen sich Unterschiede in den Altersklassen. Patienten mit EOPD haben trotz ihrer längeren Krankheitsdauer signifikant weniger kognitive Einschränkungen wie zum Beispiel bei Aufmerksamkeit, Erinnerungsvermögen oder Orientierung. Zudem ist hier ebenfalls die Progression der Probleme langsamer als bei Patienten mit LOPD (Tang et al., 2016). Auch gastrointestinale und urologische Begleitsymptome, Geruchs- oder Geschmacksstörungen, Fallsucht, Halluzinationen oder Schlafstörungen kommen bei LOPD Patienten häufiger vor (Zhou et al., 2013). EOPD-Patienten leiden dagegen häufiger an sexuellen Dysfunktionen (Guo et al., 2013) und es treten bei Ihnen häufiger Dykinesien als Nebenwirkung einer L-DOPA Therapie auf (Wickremaratchi et al., 2009).

## 1.6 Diagnose

Die Diagnose der Parkinson-Krankheit wird hauptsächlich klinisch gestellt. Hier stehen die vier Kardinalsymptome im Vordergrund. Zusätzlich müssen Ursachen sekundärer Parkinson-Syndrome ausgeschlossen sein. Die klinische Ausprägung ist jedoch nicht ausreichend für eine definitive Diagnose. Hierfür muss zusätzlich der Nachweis für neuropathologische Kriterien erbracht werden (Jankovic, 2008). Es gibt jedoch keine einheitliche Meinung zur genauen klinischen Einteilung. Das National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS) differenziert zwischen drei Genauigkeits-Stadien: Sicher, wahrscheinlich, möglich (*Engl.: definite, probable and possible*). Für ihre Einteilung benutzen sie positive Einschlusskriterien (A-Kriterien) und negative Ausschlusskriterien (B-Kriterien). Für die „sichere“ Diagnose des IPS wird zusätzlich ein neuropathologisches Kriterium benötigt (Gelb et al., 1999, Jankovic, 2008). Die „UK Parkinson’s Disease Society Brain Bank Clinical Diagnostik Criteria“ ([siehe Anhang 6.2](#)) sind die Kriterien, die am häufigsten in klinischen Studien verwendet werden und immer noch als der Goldstandard gelten. Danach werden drei Voraussetzungen gefordert, um die klinische Diagnose eines IPS zu stellen:

1. Akinese und mindestens ein zusätzliches Kardinalsymptom (Rigor, Tremor (4-6 Hz) oder posturale Instabilität)
2. Ausschluss aller Ursachen anderer (sekundärer) Parkinson Syndrome
3. Zusätzlich mindestens drei der folgenden Kriterien:
  - Einseitiger Beginn
  - Ruhetremor
  - progredienter Verlauf
  - persistierende Asymmetrie
  - gutes Ansprechen auf L-Dopa
  - L-Dopa induzierte Dyskinesien
  - Ansprechen auf L-Dopa über mindestens 5 Jahre
  - Krankheitsverlauf über mindestens 10 Jahre

Während die unter Punkt 3 genannten Kriterien nach Oertel als unterstützende Kriterien gewertet werden, werden von der UK Parkinson's Disease Brain Bank mindestens drei der aufgeführten Kriterien in Kombination mit Punkt 1 gefordert, um die Diagnose einer Parkinson-Krankheit stellen zu können (Hughes et al., 1992). Von der Deutschen Gesellschaft für Neurologie wurden jedoch die Diagnosekriterien für die Parkinson-Krankheit nach Oertel (Oertel W, 2012) in die Leitlinien von 2016 übernommen (Dodel, 2016).

Das IPS bleibt auf Grund der vielen sekundären Parkinson Syndrome eine Ausschlussdiagnose. Dementsprechend kann die richtige Diagnose schwer zu stellen sein. Trotz der weit gefassten Diagnosekriterien treten die ersten Symptome erst dann auf, wenn schon bis zu 60% der nigrostriatalen Neurone degeneriert sind (Becker et al., 2002, Fearnley and Lees, 1991). Um die Diagnose zu erhärten und andere Differentialdiagnosen aus zu schließen, werden verschiedene klinische und apparative Tests durchgeführt. Bei den klinischen Tests werden Feinmotorik, Geruchssinn und Schriftbild auf eventuelle Auffälligkeiten untersucht (Gerlach et al., 2008). Heute stehen neben den klinischen Tests auch bildgebende Verfahren wie die Computertomographie

(CT) oder die Magnetresonanztomographie (MRT) zur Verfügung, die für die Differentialdiagnose von vaskulären, tumorösen und traumatischen Schäden, entzündlichen Prozessen oder z.B. der Multi-System-Atrophie notwendig sind. Mit der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) und der Single-Photon-Emissions-Computer-Tomographie (SPECT) können Aussagen zur Zellzahl in der Substantia nigra, den Dopamin-Rezeptoren und Aufnahme- und Transportverhalten von L-Dopa an der Blut- Hirn-Schranke untersucht werden (Becker et al., 2002). Ein Staging kann mittels der von der Movement Disorder Society gesponserten Unified Parkinsons Disease Rating Scale (MDS-UPDRS) erfolgen (Goetz et al., 2008).

### **1.7 Neuropathologie beim Parkinson – Syndrom**

Die typische schwarze Färbung der Substantia nigra im Mittelhirn beruht auf der Anwesenheit von Neuromelanin. Ein Verlust der Pigmentierung in der Substantia nigra wurde erstmals von Tretiakoff bei post-mortem Untersuchungen von Parkinson-Patienten beschrieben (Lees et al., 2008). Dieses Diagnose-Kriterium hat seine Ursache in der Degeneration von dopamin- und neuromelaninhaltigen Neuronen in diesem Hirnareal. Der daraus resultierende Dopamin-Mangel in dem nachgeschalteten Hirnareal, dem Striatum mit seinen Anteilen Nucleus caudatus und Putamen, wird bei allen Formen des Parkinson-Syndroms gefunden (Gerlach, 2007). Aber auch andere neuronale Systeme sind von zellulärer Degeneration betroffen. Hierzu gehören zum Beispiel das dopaminerge mesocorticolimbische System, der noradrenalinhaltige Nucleus coeruleus, der Kortex und verschiedene peptiderge Hirnstammkerne (Jellinger, 1991). Durch den Dopamin-Mangel im Putamen kommt es zu einem Ungleichgewicht von inhibierenden und aktivierenden Leitungsbahnen des motorischen Regelkreises. Die hemmende Wirkung von der Gamma-Aminobuttersäure (GABA) auf die Substantia nigra pars reticularis und der Globus pallidus pars medialis ist dadurch herabgesetzt und deren wiederum hemmende Wirkung auf den aktivierenden Thalamus wird verstärkt. Diese, normalerweise aktivierende, Leitungsbahn wird also inhibiert. Hinzu kommt eine verstärkte Inhibition des Globus pallidus pars lateralis. Seine sonst hemmende Wirkung auf den Nucleus subthalamicus fällt aus und es resultiert



erneut eine verstärkte Aktivierung der Substantia nigra pars reticularis und des Globus pallidus pars medialis. Insgesamt resultiert ein Übergewicht von motorisch inhibierenden Wirkungen.

Ein weiteres neuropathologisches Merkmal des IPS ist das Vorkommen von sogenannten Lewy-Körperchen im neuronalen Perikaryon der dopaminergen Neurone. Hierbei handelt es sich immunhistochemisch um zytoplasmatische Einschlüsse, bestehend aus  $\alpha$ -Synuclein und Ubiquitin (Gibb, 1986, Goedert, 2001). Diese Einschluss-Körperchen werden nicht nur in der Substantia nigra, sondern auch in extranigralen Hirnarealen, wie dem Hippocampus, dem Hypothalamus, der Formatio reticularis und verschiedenen Kernen der Medulla oblongata gefunden (Braak et al., 1995). Der Hauptbestandteil der Lewy-Körperchen ist die aggregierte Form des präsynaptischen  $\alpha$ -Synucleins, weswegen man den M. Parkinson zu den  $\alpha$ -Synucleinopathien zählt (Galvin et al., 2001). Aktuelle Untersuchungen zeigen, dass  $\alpha$ -Synuclein mit präsynaptischen Vesikeln und der kontrollierten Abgabe von Dopamin interagiert (Schulz-Schaeffer, 2010). Die Lewy-Körperchen sind jedoch nicht die einzige Lokalisation für aggregiertes  $\alpha$ -Synuclein. Bis zu 90% des aggregierten  $\alpha$ -Synuclein befindet sich in der Präsynapse in Form von sehr viel kleineren aggregierten Teilen. Schulz-Schaeffer berichtet dazu über die Hypothese, dass die synaptischen Aggregationen von  $\alpha$ -Synuclein eher zur Degeneration von Dendriten der Neurone führt als zu neuronalen Zelltod (Schulz-Schaeffer, 2010).

Die Frage, ob es andere Gewebe gibt, die für eine Biopsie zugänglich sind und gleichzeitig Hinweise auf eine PE geben, hat mehrere Arbeitsgruppen beschäftigt. Unter anderem wurde  $\alpha$ -Synuclein in der Colonmucosa von EOPD-Patienten, jedoch nicht bei gesunden Kontrollpersonen gefunden, so dass die Colonmucosa ein erreichbares Biomarker Gewebe sein könnte (Wakabayashi et al., 2010, Shannon et al., 2012). Zusätzlich zu dem Verlust von dopaminergen Neuronen in der Substantia nigra pars compacta und der Lewy Pathologie zeigen Hirne von Patienten mit Parkinson eine vermehrte Gliose (McGeer and McGeer, 2008). Die Gliose geht auf eine gesteigerte Zahl und Aktivität von Astrozyten und Mikroglia zurück. Beide Zelltypen können auf eine Schädigung mit der Änderung ihrer Morphologie und mit der Produktion und

Sekretion inflammatorischer Moleküle reagieren (Colton and Wilcock, 2010). Ein erhöhter Eisengehalt in den Gehirnen von Parkinson-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen wird ebenfalls beobachtet und ist Gegenstand von verschiedenen Studien sowohl am Menschen als auch im Tierversuch (siehe Abschnitt 1.8.3).

## **1.8 Ätiologie**

Die genaue Ätiologie der Parkinson-Krankheit ist noch nicht bekannt. Bis zu 90% der Fälle treten sporadisch auf. Daher stammt auch der Name idiopathisches Parkinson-Syndrom (IPS). In den letzten Jahren wurden viele Theorien aufgestellt, die die genaue Ätiologie der Parkinson-Krankheit erklären sollten. Hierzu zählen oxidativer Stress, Proteinaggregation, Inflammation, mitochondriale Dysfunktion, Apoptose und viele mehr. Es konnte jedoch keine Theorie allein die genauen Mechanismen in der Pathogenese vom IPS erklären. Die derzeitige Lehrmeinung geht daher von einer multifaktoriellen Genese aus, in der verschiedene Vorgänge zusammen spielen (Olanow, 2007, Sulzer, 2007). Allen diesen Faktoren ist gemeinsam, dass sie zelluläre Bestandteile bzw. molekulare Mechanismen stören, schädigen oder zerstören.

### **Alterungsprozesse**

Die Parkinson-Krankheit ist eine der besten Beispiele für eine altersbezogene Erkrankung. Das Alter beeinflusst den klinischen Progress und ist ein wesentlicher Risikofaktor für die sporadische Parkinson-Krankheit (Mayeux et al., 1992). Ältere Menschen können milde parkinsonähnliche Symptome zeigen, die auf eine altersabhängige Abnahme an dopaminergem Aktivität, begleitender Lewy Körper Erkrankung, degenerativen Pathologien oder vaskulären Pathologien beruhen (Hindle, 2010). Mehrere Studien haben gezeigt, dass das fortschreitende Alter mit einer schnelleren motorischen Progression, vermindertem Ansprechen auf Levodopa, schwererer Beeinträchtigung von Stand und Gang, schwererer geistiger Beeinträchtigung und der Entwicklung einer Demenz bei Menschen mit einer Parkinson-Krankheit vergesellschaftet ist (Levy, 2007).

### ***Exogene Faktoren***

Derzeit gibt es eine Reihe von exogenen Faktoren, bei denen man eine Mitbeteiligung an der Entstehung der Parkinson-Krankheit entweder nachgewiesen hat oder noch vermutet. Vor allem die Intoxikation bzw. der langjährige Kontakt mit Pestiziden und verschiedenen Schwermetallen können hierzu beitragen (Elbaz and Tranchant, 2007). Hier ist besonders das Neurotoxin 1-Methyl 4-phenyl 1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) zu nennen. Das Neurotoxin kann die Bluthirnschranke passieren und schädigt durch die Bildung von Hydroxylradikalen Neurone im Striatum. Nach der Umwandlung durch die Monoaminoxidase B (MAO-B) zu 1-Methyl-4-phenyl-pyridin (MPP+) hemmt es irreversibel den Komplex I der Atmungskette und es kommt zu vermehrtem Anfallen von freien Radikalen (Abdulwahid Arif and Ahmad Khan, 2010). MPTP vermindert außerdem die mitochondriale Aktivität und mitochondriale Genexpression. Zudem konnten MPTP-induzierte Proteinveränderungen in verschiedenen Hirnregionen aufgezeigt werden. Deren Funktionen liegen zum Teil beim Ansprechverhalten auf oxidativen Stress, Apoptose und Dopamin-Signalwegen (Zhang et al., 2010). Diese Erkenntnis wird seit Jahren in zahlreichen Tierversuchen genutzt, um z.B. bei Mäusen parkinsonähnliche Krankheitsbilder zu erzeugen und diese danach gezielt untersuchen zu können. Interessanterweise haben Studien auch „protektive“ Faktoren gefunden, die einen positiven Einfluss auf die Häufigkeit der Parkinson-Krankheit haben können. Zu nennen sind hier zum Beispiel Koffein, Nicotin und Harnsäure (Wirdefeldt et al., 2011). Sowohl Nicotin als auch Koffein wurde ein protektiver Effekt beim Parkinson zugeschrieben und für Nicotin wurde gezeigt, dass es die Fibrillisation von  $\alpha$ -Synuclein hemmt (Kalda et al., 2006, Ono et al., 2007, Quik, 2004). Höhere Harnsäurespiegel waren zum Beispiel verbunden mit verminderter Häufigkeit der Parkinson-Krankheit und einer geringeren Rate der Verschlechterung bei Patienten mit Parkinson (Ascherio et al., 2009, Winqvist et al., 2010).

### ***Endogene Faktoren***

Zu den endogenen Faktoren, die eine Rolle in der Pathogenese der Parkinson-Krankheit spielen könnten, gehören oxidativer Stress,

Eisenstoffwechselstörungen, mitochondriale Dysfunktion, Inflammation und Proteinaggregation.

### **1.8.1 Inflammation**

Durch geschädigte Nervenzellen werden verschiedene entzündungsfördernde Reaktionen ausgelöst. Es kommt zu einer Synthese von proinflammatorischen Zytokinen durch aktivierte T-Lymphozyten und zu einer Aktivierung und Einwanderung von Makrophagen bzw. Mikrogliazellen. Es konnte gezeigt werden, dass eine inflammatorische Immunreaktion, ausgelöst durch den Zelluntergang bei der Parkinson – Krankheit, eine bedeutende Rolle in ihrer Pathogenese spielt (Hartmann et al., 2003, Stone et al., 2009). Sowohl bei Untersuchungen an post-mortem Gehirnen von Parkinson-Patienten, als auch bei Tierversuchen wurden erhöhte Konzentrationen von Immun-Zellen und entzündungsfördernden Zytokine im nigrostriatalen System gefunden. Reynolds et al. konnten zudem eine Aktivierung von Mikroglia durch ein überexprimiertes oder aggregiertes  $\alpha$ -Synuclein zeigen (Reynolds et al., 2008). Aktivierte Mikroglia und Zytokine, wie Interleukine und TNF-alpha, spielen danach in der Pathogenese von Parkinson eine besondere Rolle (Hirsch et al., 2003, Pott Godoy et al., 2008, Sawada et al., 2006). Eine inflammatorische Reaktion bedingt zudem eine Generierung von reaktiven oxidativen Substanzen (*reactive oxygen species*, ROS), die zu oxidativem Stress und zusätzlicher Zellschädigung führen können.

### **1.8.2 Oxidativer Stress**

Oxidativer Stress wird mit der Ätiologie von verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen in Verbindung gebracht. Ein erhöhtes Aufkommen von oxidativen bzw. stickoxidhaltigen Substanzen wird auch in der Pathogenese der PE als einer der wichtigsten Faktoren gesehen (Emerit et al., 2004, Tsang and Chung, 2009). Hervorgerufen wird der oxidative Stress durch Anreicherung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffradikalen (ROS; *reactive nitrogen species*, RNS). Ausgangspunkt in der Entstehung von ROS ist vor allem die Atmungskette. Hier treten freie Elektronen aus und reagieren mit molekularem Sauerstoff. Durch diese Reduktion entstehen Superoxide, die wiederum mit

anderen Molekülen weitere ROS freisetzen können (Cadenas and Davies, 2000). Aber auch eine inflammatorische Reaktion kann zu einer Generierung von ROS führen. Beim Parkinson wurden schon früh Defekte in der Atmungskette nachgewiesen. Betroffen ist hier vor allem der Komplex I der Atmungskette, aber auch andere Teile der Mitochondrien können betroffen sein (Schapira, 1993, Zhu and Chu, 2010). RNS entsteht z.B. aus der Reaktion von Superoxidanionen und dem Neurotransmitter Stickstoffmonoxid (NO). NO kann bei Überangebot aber auch selber mit Proteinen reagieren und Schäden verursachen (Reynolds et al., 2007, Chung, 2006). Die reaktiven Sauerstoffradikale wie z.B. Superoxide, Nitritdioxide oder Hydroxylradikale, bedingen eine Schädigung von DNA, Proteinen, Zellwänden und Mitochondrien. Durch die Einwirkung des oxidativen Stresses werden von Astrozyten und Mikrogliazellen vermehrt Zytokine exprimiert, welche wiederum die Produktion von proinflammatorischen Stoffen wie Chemokine, Wachstumsfaktoren und zusätzlich Sauerstoffradikale bildende Enzyme induzieren. Durch die Schädigung von Mitochondrien werden Apoptose induzierende Kinasen freigesetzt, welche einen frühzeitigen Zelltod herbeiführen. Ein vermehrtes Anfallen von reaktiven Sauerstoffradikalen führt zu einer Beschleunigung dieser Prozesse und einem vermehrten Zelluntergang oder Schädigung von Proteinen (Shibata and Kobayashi, 2008). So konnten Giasson et al. zeigen, dass durch oxidativen Stress beschädigtes  $\alpha$ -Synuclein vorwiegend in Lewy-Körperchen gespeichert wird (Giasson et al., 2000). Ein weiterer Hinweis auf die Wichtigkeit von oxidativem Stress bei der Parkinson-Krankheit sind auch die gefundenen Gene, deren Mutation oft auch zu einem EOPD führen (siehe 1.9). Gene wie das  $\alpha$ -Synuclein Gen (PARK1), Parkin Gen (PARK2), PINK1 Gen (PARK6), DJ-1 Gen (PARK7) haben verschiedene Funktionen im Bereich der Mitochondrien oder Proteinaggregation, die entweder zu erhöhtem oxidativen Stress führen oder durch oxidativen Stress stark beeinflusst werden können (Lin et al., 2009, Schrag and Schott, 2006).

### **1.8.3 Protein-Aggregation**

Bei einer Schädigung von Proteinen kann es durch Advanced-Glycation-Endproducts (AGEs) induziertes Crosslinking zu einer Konformationsänderung

kommen, die zu einer Protein-Aggregation führt. Durch die aggregierte Form, kann das beschädigte Protein nicht mehr vollständig von den zuständigen Stoffwechselwegen abgebaut werden. Wie schon oben beschrieben ist ein zytologisches Charakteristikum der Parkinson-Krankheit das Auftreten von Lewy-Körperchen, mit aggregiertem  $\alpha$ -Synuclein als Hauptbestandteil. Munch et al. konnten für das  $\alpha$ -Synuclein ein AGEs induziertes Crosslinking in frühen Formen von Parkinson nachweisen (Munch et al., 2000). Zusätzlich konnten bereits verschiedene Mutationen im  $\alpha$ -Synuclein Gen nachgewiesen werden, die zu familiärem Parkinson führen (siehe „Genetik beim EOPD“ 1.9). Zu den Systemen, die für den Abbau von  $\alpha$ -Synuclein verantwortlich sind, gehören z.B. das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) oder der Chaperon-vermittelte Autophagie-Stoffwechselweg. Sowohl bei der UPS als auch bei dem Chaperon-vermittelten Autophagie-Stoffwechselweg hat man bereits Mutationen bzw. Störungen gefunden, die bei Parkinson zu einem erhöhten Aufkommen von  $\alpha$ -Synuclein führen. So führen Mutationen im Parkin Gen (PARK2), welches für eine E3 Ligase des UPS kodiert, zu einem autosomal-rezessiven EOPD (Periquet et al., 2003). Aber auch die Schädigung von  $\alpha$ -Synuclein durch oxidativen Stress kann ein Anhäufen dieser Proteine verursachen.

#### **1.8.4 Gestörter Eisenmetabolismus**

Ein weiteres pathologisches Merkmal der Parkinson-Krankheit ist ein erhöhter Eisengehalt im Gehirn von Parkinson-Patienten. Die Substantia nigra und der Globus pallidus sind hierbei besonders betroffen. In verschiedenen Studien wurde dieses Merkmal sowohl in post-mortem Gehirnen, als auch bei lebenden Patienten nachgewiesen (Gotz et al., 2004, Michaeli et al., 2007). Höhere Level vom divalenten Metall Transporter 1 (DMT1) und der Verlust der Herunterregulierung von DMT1 als Reaktion auf erhöhte Eisenspiegel wurden postmortal in Hirnen von Patienten mit Parkinson gefunden und geben ebenfalls einen Hinweis auf einen gestörten Eisenstoffwechsel (Howitt et al., 2014). Auch in einer kleinen Gruppe von Patienten mit EOPD wurde ein erhöhter Eisengehalt in der Substantia nigra pars compacta nachgewiesen (Martin et al., 2008).

Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass ein erhöhter Eisengehalt mit der Ätiologie der Parkinson-Krankheit in Verbindung steht. In unterschiedlichen Tierversuchen an Ratten und Mäusen konnte diese Theorie erhärtet werden. Ein durch Infusion oder Injektion erzeugter erhöhter zerebraler Eisengehalt bewirkte hier eine Reduktion der Dopaminkonzentration in den untersuchten Gehirnantteilen (Wesemann et al., 1994). Lan und Jiang konnten zusätzlich einen Zusammenhang zwischen künstlich angehobenem Eisengehalt und erhöhtem oxidativen Stress nachweisen. In Kombination mit Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) reagiert zweiwertiges Eisen ( $Fe^{2+}$ ) durch die Fenton-Reaktion zu reaktiven Sauerstoffspezies. Zudem scheint Eisen die Aggregation von  $\alpha$ -Synuclein in Lewy-Körpern mit zu induzieren (Lan and Jiang, 1997, Uversky et al., 2001).

Die zentrale Rolle von Eisen an der Pathologie der Parkinson-Krankheit wird durch Studien gestützt, die gezeigt haben, dass die Verabreichung von Fe-Chelaten und die Überexprimierung von Eisenbindungsproteinen in Parkinson-Tierversuchen neuroprotektiv wirken (Gal et al., 2006, Devos et al., 2013).

In einer kleinen placebokontrollierten, randomisierten Doppel-Blindstudie konnten Devos et al. die Wirkung von dem Eisenchelator Deferiprone in einer klinischen Studie nachweisen. So konnte in den mit Deferiprone behandelten Patienten eine signifikante Reduktion des Eisengehaltes in der Substantia nigra als auch eine langsamere Krankheitsprogression festgestellt werden (Devos et al., 2014). Studien mit größeren Patientenzahlen sind bisher jedoch noch nicht veröffentlicht.

Auch andere neurodegenerative Erkrankungen gehen mit einem erhöhten Eisengehalt im Gehirn einher. Hierunter fallen mit der Alzheimer Erkrankung die häufigste neurodegenerative Erkrankung Deutschlands (Squitti, 2012), die infantile neuroaxonale Dystrophie (INAD) und Neurodegeneration mit erhöhtem Eisengehalt im Gehirn (NBIA) (Morgan et al., 2006). Bei den beiden zuletzt genannten sind wie bei dem EOPD jüngere Patienten betroffen (siehe 1.10).

## **1.9 Die Genetik beim EOPD**

In der multifaktoriellen Genese der Parkinson-Krankheit hat die Genetik unterschiedlich starken Einfluss. Aufgrund der unterschiedlichen Zeitpunkte des

Beginns der Erkrankung vermutet man größeren bzw. geringeren Einfluss. Je später der Beginn, desto größer ist der Einfluss von exogenen Faktoren und des Alters. Bei einem frühen Beginn wie beim EOPD ist die Bedeutung von genetischen Einflüssen größer. Dies zeigt sich zum Beispiel an dem größeren Anteil von familiärem Parkinson bei EOPD im Gegensatz zur Parkinson-Krankheit mit normalem oder spätem Beginn (Payami et al., 2002). Es wurden bereits viele Gene erforscht und untersucht, die mit der Parkinson-Krankheit in Verbindung gebracht worden sind. So trugen Untersuchungen von mutierten Genen in den letzten Jahren viel zu dem Verständnis der Ätiologie und der Pathologie der Erkrankung bei (siehe [1.9. Ätiologie](#)). Die Ergebnisse bezogen sich sowohl auf die Parkinson-Krankheit im Allgemeinen aber auch speziell auf familiär bzw. sporadisch auftretendes EOPD. Gene, die man mit Parkinson in Verbindung bringt, werden vereinfacht mit PARK benannt. Diese werden nach zeitlichem Auftreten ihrer Beschreibung fortlaufend nummeriert. Im September 2017 führte die Gene-Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) die Gene PARK1 bis PARK23 auf (Gene, 2017).

Im folgenden Abschnitt werden die 11 Gene, die mit dem EOPD assoziiert sind, näher betrachtet. Von diesen haben drei einen autosomal-dominanten Erbgang (PARK 1/PARK4, PARK8 und PARK17) und acht einen autosomal-rezessiven Erbgang (PARK2, PARK6, PARK7, PARK9, PARK14 und PARK15, PARK 19, PARK20).

### **1.9.1 $\alpha$ -Synuclein Gen, PARK1, PARK4**

Erstmals wurde eine Mutation im  $\alpha$ -Synuclein Gen in einer großen Familie aus Italien nachgewiesen. Als Folge einer Punktmutation kommt es zu einer falschen Faltung des Proteins und zur Aggregation von  $\alpha$ -Synuclein mit folgendem Nervenzelluntergang. Die autosomal-dominant vererbte Mutation auf Chromosom 4q verursacht Parkinson mit frühem Beginn (EOPD) und wurde mit PARK1 benannt (Polymeropoulos et al., 1997). Mittlerweile wurden zwei weitere Mutationen im  $\alpha$ -Synuclein Gen gefunden. Betroffen waren auch diesmal große Familien. Auch Duplikationen des Gens und dadurch folgende Überexprimierung von  $\alpha$ -Synuclein verursachen eine autosomal-dominant vererbte Parkinson-Krankheit (Chartier-Harlin et al., 2004). Die Mutationen im  $\alpha$ -



Synuclein Gen sind jedoch selten. Im Durchschnitt beginnt die Erkrankung in der vierten Lebensdekade und gleicht im Phänotyp der klassischen Parkinson-Krankheit. Atypische Symptome wie schwere autonome Störungen oder starke Demenz können aber auch auftreten (Spira et al., 2001).

### **1.9.2 Parkin Gen, PARK2**

Das häufigste, rezessiv vererbte Parkinson-Gen kodiert für Parkin. Es ist auf der telomerischen Region des langen Arms von Chromosom 6 zu finden und kodiert für ein zytoplasmatisches Protein mit der Funktion einer E3 Ligase des UPS, das an der Modulation von prosynaptischen Proteinen wie zum Beispiel  $\alpha$ -Synuclein beteiligt ist (Moore, 2006). Mehr als hundert Mutationen in diesem Gen wurden bereits gefunden, die alle ein autosomal-rezessives Parkinson-Syndrom bedingen. Mutationen im Parkin Gen ist die häufigste monogen auftretende Ursache für ein EOPD. Fast die Hälfte aller EOPD – Patienten mit familiärer Häufung der Erkrankung und auch bis zu 20% der sporadischen Fälle haben ein mutiertes Parkin Gen. Bei Patienten mit einem Beginn der Erkrankung nach dem 45. Lebensjahr sind jedoch nur noch sehr selten Parkinson-Mutationen zu finden (Periquet et al., 2003). Die Erkrankung kann schon früh mit Fluktuationen, Dyskinesien oder Dystonien beginnen. Neben den Kardinalsymptomen können Festinationen, Retropulsionen, autonome Dysfunktion oder Schlafstörungen auftreten. Diese sind jedoch nicht spezifisch für Patienten mit Mutationen im Parkin Gen, sondern treten auch bei anderen EOPD-Patienten auf (Schrag and Schott, 2006).

### **1.9.3 PINK1 Gen, PARK6**

Das PINK1 Gen ist auf dem kurzen Arm des Chromosom 1 lokalisiert. Im Jahr 2004 konnten Valente et al. zeigen, dass Mutationen in diesem Gen sowohl ein familiäres als auch ein sporadisches EOPD auslösen (Valente et al., 2004a, Valente et al., 2004b). Zwischen 1 und 4% aller EOPD – Patienten weisen Mutationen im PINK1 Gen auf. Damit ist es nach dem Parkin Gen das zweithäufigste PARK Gen, das ein autosomal-rezessives EOPD auslöst. Die Krankheit tritt bei betroffenen Personen zwischen dem 30. und dem 50. Lebensjahr auf und hat einen ähnlichen Phänotyp wie bei Patienten mit Parkin-

Mutationen (Bonifati et al., 2005, Kumazawa et al., 2008). Die genaue Funktion des Gens ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Sicher ist, dass es wichtig für die Regulation der mitochondrialen Aktivität und von Schutzvorgängen zur Vermeidung von oxidativem Stress ist. Zum Beispiel kommt es durch die Interaktion mit dem TRAP1 (TNF receptor-associated protein 1) zu einer Suppression der Freisetzung von Cytochrom C und damit zum Schutz vor oxidativem Stress (Chu, 2010, Pridgeon et al., 2007). Klinisch zeigen die betroffenen Patienten ein ähnliches, langsam progredientes Bild wie Patienten mit Parkin oder DJ-1 Mutationen, wobei auch atypische Verläufe mit ausgeprägter Dystonie oder psychiatrischen Auffälligkeiten möglich sind (Nuytemans et al., 2010).

#### **1.9.4 DJ-1 Gen, PARK7**

Ein weiteres Gen, das ein autosomal-rezessives EOPD hervorruft, ist das DJ-1 Gen. Es liegt wie das PINK1 Gen auf dem kurzen Arm des Chromosom 1. Mutationen in diesem Gen, die zu einem EOPD führten, wurden von Bonifati et al. erstmals bei holländischen und italienischen Familien beschrieben (Bonifati et al., 2003). Mutationen im DJ-1-Gen (PARK7) sind mit etwa 1% die bislang seltenste Ursache für ein früh beginnendes Parkinson-Syndrom (Gasser et al., 2011). Es liegt wie das PINK1 Gen auf dem kurzen Arm des Chromosom 1. Unter den ca. 20 verschiedenen Mutationen (Exonduplikation, Punktmutationen, Basen- und Exondeletionen) kommt die Hälfte als heterozygote Mutationen vor. Durch ein defektes DJ-1 Gen, kommt es zu einer eingeschränkten mitochondrialen Translokation von oxidiertem DJ-1 und damit zu einer Störung der Aufrechterhaltung der mitochondrialen Funktion und Integrität (Krebiehl et al., 2010). Durch Bindung an ein 20S-Proteasom ist es zudem mitregulierend bei der Reaktion auf oxidativen Stress und den Abbau von oxidativ geschädigten Proteinen (Moscovitz et al., 2015). Der Beginn der Erkrankung liegt zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr und die klinische Ausprägung gleicht der von Patienten mit Parkin- und PINK-Gen Mutationen. Die Progression der Erkrankung ist jedoch im Vergleich langsamer (Hedrich et al., 2004, Nuytemans et al., 2010).

### **1.9.5 LRRK2 Gen, PARK8**

Das LRRK2 Gen (PARK8) liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 12 und verursacht bei Mutationen ein autosomal-dominantes Parkinson-Syndrom. Das Gen kodiert für die *leucine-rich repeat kinase 2* (LRRK2) (Paisan-Ruiz et al., 2004). Die meisten Patienten mit Mutationen im LRRK2 Gen haben ein Parkinson-Syndrom mit Symptombeginn nach dem 50. Lebensjahr. Bis 5% der familiären und 1,6% der sporadischen Parkinson-Krankheiten können auf das LRRK2 Gen zurück geführt werden (Gilks et al., 2005, Nichols et al., 2005). Aber auch bei Patienten mit einem EOPD konnten Mutationen in diesem Gen nachgewiesen werden (Macedo et al., 2009, Möller et al., 2008). Der Phänotyp der Patienten mit LRRK2 Mutationen ist mit den Kardinalsymptomen typisch für die Parkinson-Krankheit. Insgesamt scheinen die Patienten aber einen leichteren, langsameren Verlauf und ein geringeres Auftreten von Demenz und psychiatrischen Komplikationen zu zeigen (Berg et al., 2005).

### **1.9.6 ATP13A2, PARK9**

Mutationen im ATP13A2-Gen führen zu einem sehr seltenen autosomal-rezessiven Parkinsonismus mit einem komplexen Phänotyp (Kufor-Rakeb Syndrom). Das Gen liegt auf dem Chromosom 1p36, welches für eine neuronale P-Typ ATPase kodiert und es sind mehrere Missense-Mutationen beschrieben (Di Fonzo et al., 2007). Das Kufor-Rakeb Syndrom (KRS) ist ein extrapyramidal-pyramidales Syndrom mit generalisierter Hirnatrophie. Der Phänotyp ist ein autosomal-rezessives EOPD mit motorischen Fluktuationen, pyramidalen Zeichen, Dyskinesien und Demenz. Die Phänotypen können jedoch je nach Mutation in ihrer Schwere variieren (Ramirez et al., 2006, Di Fonzo et al., 2007). Patienten mit Mutationen im ATP13A2-Gen zeigen einen sehr frühen Beginn (AaO 11-16 Jahre) und eine rapide Progression der Parkinsonsymptome. Sie reagieren auf Levo-Dopa und zeigen Pyramidenbahnzeichen, Spastik und eine supranukleäre Blickparese (Najim al-Din et al., 1994, Williams et al., 2005). Schneider et al. beschrieben neben der Hirnatrophie einen erhöhten Gehalt von Eisenablagerungen im Putamen und Nucleus caudatus und zählen das Kufor-Rakeb Syndrom mit zu der

Neurodegeneration mit Eisenablagerungen im Gehirn (neurodegeneration with brain-iron accumulation = NBIA) (Schneider et al., 2010).

#### **1.9.7 FBXO7 Gen; PARK15**

Im Jahr 1954 beschrieb Davison zum ersten Mal das Pallido-Pyramidale Syndrom. Dies ist eine Parkinsonform mit Pyramidenbahnzeichen, einem frühen Beginn und schneller Progression. Aktuell wurde dieses autosomal-rezessive EOPD mit dem FBXO7 Gen (PARK15) in Verbindung gebracht. Das Gen liegt auf Chromosom 22q1 und kodiert für ein Protein der F-Box Familie, die in Bezug zum UPS steht. Im Gen sind sowohl homozygote als auch heterozygote Mutationen gefunden worden, wobei der Phänotyp dem oben beschriebenen Pallido-Pyramidalen Syndrom entspricht. Patienten mit Mutationen im FBXO7-Gen zeigen einen progressiven Parkinsonismus mit einem Beginn im 3. Lebensjahrzehnt begleitet von extrapyramidalen Symptomen, die Levo-Dopa sensibel sind. Im Kindesalter kann eine Dystonie bestehen, während Pyramidenbahnzeichen der unteren Extremität in späteren Krankheitsstadien vorkommen können (Di Fonzo et al., 2009, Luo et al., 2010).

#### **1.9.8 DNAJC6 Gen; PARK 19**

Mutationen im DNAJC6 Gen wurden 2012 von Edvardson und 2013 von Köroglu bei zwei blutsverwandten Familien beschrieben. Bei beiden Familien begann der Parkinsonismus im Alter unter 11 Jahren und zeigte eine rasche klinische Verschlechterung, die innerhalb von 10 Jahren wenig oder gar nicht mehr auf Levo-Dopa ansprach. Das Krankheitsbild war von Pyramidenbahnzeichen, Dystonie, Krampfanfällen und mentaler Beeinträchtigung gekennzeichnet (Edvardson et al., 2012, Koroglu et al., 2013). Inzwischen wurden zwei neue Mutationen im DNAJC6 Gen gefunden. Eine bei zwei Patienten mit einem familiären EOPD und die zweite heterozygote Variante bei einem Patienten mit einem sporadisch aufgetretenen EOPD. Der Krankheitsverlauf der Patienten unterschied sich deutlich von dem oben beschriebenen. Sie entwickelten den Parkinsonismus in der dritten bis fünften Lebensdekade mit einer langsameren Progredienz und einem guten

Ansprechen auf eine dopaminerge Therapie, so dass der Verlauf an das klassische EPOD erinnert (Olgiati et al., 2016).

### **1.9.9 Synj1 Gen; PARK20**

Dieses Gen wurde fast gleichzeitig in einer Familie aus Sizilien und einer aus dem Iran beschrieben, die beide die gleiche homozygote Mutation (c.7736 >A, p.Arg258Gln) im SCYNJ1 Gen aufwiesen. Beide Patienten zeigten den gleichen Phänotyp mit einem EOPD, der zusätzlich mit atypische Krankheitszeichen einher ging (Krebs et al., 2013, Quadri et al., 2013). Das Gen codiert für eine Phosphatase, die durch Ihre Funktionen, zum Beispiel durch Wiederverwertung von synaptischen Vesikeln ein Schlüsselprotein für die Regulierung der Synapsen ist (Krebs et al., 2013). Olgiati beschrieb die gleiche homozygote Mutation bei Geschwistern mit einer milden psychomotorischen Entwicklungsverzögerung, die in der 3. Lebensdekade von einem progressiven Parkinsonismus, Dystonie und milder kognitiver Beeinträchtigung gefolgt wurde. Die Therapie mit Dopamin Agonisten und Anticholinergika zeigte nur teilweise eine Verbesserung der Symptome. Ein Geschwisterkind zeigte zudem einen einmaligen generalisierten tonisch-klonischen Krampfanfall. Die PET Untersuchungen der Geschwister zeigten schwere nigrostriale dopaminerge Defekte und einen milden striatalen und sehr milden kortikalen Hypometabolismus (Olgiati et al., 2014).

### **1.10 PLA2G6 Gen; PARK 14**

Das PLA2G6 Gen wurde bereits in zahlreichen Studien zu verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen untersucht. Das Gen liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 22 (22q12-q13) und kodiert für eine Calcium unabhängige Phospholipase A2 Gruppe VI (engl. *calcium-independent phospholipase A2 VI*, iPLA2 VI). In der Literatur wird sie teilweise auch als Phospholipase A2 $\beta$  (iPLA2 $\beta$ ) benannt. Die Nukleotid-Sequenz des PLA2G6 Gens enthält 17 Exone. Jedoch zählt nicht die gesamte Sequenz der Exone zu den kodierenden Abschnitten des Gens. Die 5'UTR des PLA2G6 Gens umfasst mit insgesamt 136 Nukleotiden das gesamte Exon 1, sowie die ersten 45 Nukleotide des Exon 2. Die 3'UTR beginnt nach dem Stoppcodon im Exon 17

an Position 2558 und umfasst insgesamt 666 Nukleotide. Die gesamte protein-kodierende Region für die iPLA2 besteht demnach aus 2418 Nukleotiden.

Die iPLA2VI katalysiert die Hydrolyse von membranständigen Glycerophospholipiden an der sn-2 Position. Sie setzt dadurch Arachidonsäuren frei, die ein Vorläufer für Eicosanoide wie Prostaglandine und Leukotriene darstellt. Damit stellt sie eine entscheidende Rolle im Remodelling von Zellmembranen dar (Murakami and Kudo, 2002). Eine abnorm funktionierende Phospholipase A2 kann demnach zu einer gestörten Membranhomöostase führen. Auch eine Rolle der iPLA2-Substrate in der Transmitter vermittelten Signalkaskade für die Apoptose wird derzeit vermutet (Balsinde et al., 2006). Die Substrate der iPLA2 interagieren mit den Stoffwechselwegen zur Einleitung bzw. der Modulation von Inflammation und oxidativem Stress. Eine veränderte Aktivität der Phospholipase könnte diese Vorgänge beschleunigen und zu einem erhöhten oxidativem Stress führen. Durch die Mitwirkung an der Freisetzung bzw. der Synthese von oxidativen und proinflammatorischen Zytokinen wurde sie schon früh in Bezug mit neurodegenerativen Erkrankungen gebracht (Sun et al., 2004, Sun et al., 2005, Muralikrishna Adibhatla and Hatcher, 2006). Farooqui et al. postulierten in ihrem Review sogar die Möglichkeit, dass für neurodegenerative Erkrankungen Inhibitoren der Phospholipase als neuroprotektive Mittel eingesetzt werden könnten (Farooqui et al., 2006).

Das ein mutiertes PLA2G6 Gen in Verbindung mit neurodegenerativen Erkrankungen steht, konnten auch Morgan et al. zeigen. Die Arbeitsgruppe untersuchte das PLA2G6 Gen bei zwei neurodegenerativen Erkrankungen im Kindesalter die beide – wie auch die Parkinson-Krankheit – mit einem erhöhten Eisengehalt im Gehirn einhergehen. Patienten mit infantiler neuroaxonaler Dystrophie (INAD) und Neurodegeneration mit erhöhtem Eisengehalt im Gehirn (NBIA) wurden auf Polymorphismen im PLA2G6 Gen untersucht. Morgan et al. konnten im größten Teil der INAD Patienten und in einem kleinen Teil der NBIA Patienten PLA2G6 Mutationen nachweisen, während gesunde Kontrollen keine Mutationen aufwiesen. Sie sahen einen klaren Zusammenhang zwischen Mutationen im PLA2G6 Gen und neurodegenerativen Erkrankungen vor allem im Zusammenhang mit einem erhöhten Eisengehalt im Gehirn (Morgan et al.,

2006). Diese Ergebnisse wurden von der Arbeitsgruppe um Gregory et al. in einer größeren Patientenpopulation ebenfalls nachgewiesen. In dieser zweiten Studie wurden in 79% (INAD) bzw. 20% (NBIA) der Patienten Mutationen im PLA2G6 Gen gefunden. Der Genotyp korrelierte hierbei mit dem Phänotyp. Schwere Nonsense-Mutationen waren mit einem früheren Beginn und schnellerer Krankheitsprogression vergesellschaftet, während heterozygote Missense-Mutationen zu weniger schwerem Verlauf führten. In fast allen Patienten mit PLA2G6 Mutationen wurde zudem eine cerebelläre Atrophie nachgewiesen (Gregory et al., 2008). Im gleichen Jahr fasste die Arbeitsgruppe um Kurian et al. die unterschiedlichen neurodegenerativen Erkrankungen, die mit Mutationen im PLA2G6 Gen einhergehen, als PLAN (engl.: *PLA2G6 – associated neurodegeneration*) zusammen, zu dem NBIA, INAD und das Karak Syndrom gezählt werden (Kurian et al., 2008). Dies betont den Zusammenhang zwischen Mutationen im PLA2G6 Gen und neurodegenerativen Erkrankungen mit frühen Krankheitsbeginn wie auch EOPD.

### **1.11 Zielsetzung dieser Studie**

Wie bei allen Formen der Parkinson-Krankheit wird auch für das EOPD eine multifaktorielle Genese postuliert. Für die genaue Ätiologie kommen, wie oben beschrieben, zahlreiche Aspekte und Pathomechanismen zusammen. Eine besondere Rolle wird hier vor allem dem oxidativen Stress und mitochondrialen Dysfunktionen zugeteilt. Die Calcium unabhängige Gruppe VI Phospholipase A2 (iPLA2) spielt eine Rolle bei der Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen, die einen oxidativen Stress für Zellorganellen, Enzyme und Zellwand bedingen. Erhöhter oxidativer Stress führt wiederum zur Zellschädigung und frühzeitigem Zelltod. Sowohl ein sporadisches als auch ein familiäres EOPD wird oft durch Mutationen in Zielgenen verursacht und viele Gene wurden, wie oben beschrieben, bereits ausfindig gemacht. Verschiedene Mutationen im PLA2G6 Gen, dass für die iPLA2VI kodiert, wurden bereits bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen mit geringem AaO (INAD und NBIA) nachgewiesen. Ziel dieser experimentellen Studie war es, vermutete Mutationen in der Nukleotidsequenz des PLA2G6-Gens bei Parkinson-Patienten mit frühen Krankheitsbeginn nachzuweisen und zu beschreiben. Zudem sollten die Ergebnisse mit Kontrollgruppen aus gesunden Probanden verglichen werden. Mutationen in diesem Gen könnten eine Beteiligung der Calcium unabhängigen Gruppe VI Phospholipase A2 an der multifaktoriellen Genese des EOPD aufzeigen.



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Probandenkollektive

Die Patienten und Kontrollpersonen dieser Studie waren in der Datenbank der Klinik für Neurologie an der Philipps-Universität Marburg gelistet und stammten alle aus der Bundesrepublik Deutschland. Die Daten wurden innerhalb des Forschungsprojektes „Genetische Untersuchungen bei neurologischen Patienten mit Bewegungsstörungen“ erhoben. Dieses war von der Ethikkommission des Fachbereiches Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg unter der Projektnummer 70/97 angenommen worden. Alle Patienten und Kontrollpersonen wurden darüber aufgeklärt, dass ihr Blut für genetische Untersuchungen verwendet wird. Eine unterschriebene schriftliche Einwilligungserklärung lag für alle Personen vor.

Bei allen untersuchten Patienten wurde ein EOPD diagnostiziert und sie erfüllten die Kriterien der UK Society Brain Bank, welche im [Anhang 6.2](#) aufgeführt sind (Hughes et al., 1992). Wir definierten das EOPD mit einem Beginn der Erkrankung vor oder im 50. Lebensjahr (*Age of onset*  $\leq$  50 years). Die gesunden Kontrollpersonen wurden per Telefon kontaktiert und mit einem halbstandardisierten Interview befragt. Mögliche Symptome, die auf eine Erkrankung mit einer Parkinson-Krankheit oder anderen Bewegungsstörungen hinweisen konnten, wurden durchgegangen. Ausschlusskriterium war das Auftreten eines solchen Symptoms. Anschließend wurde über den Hausarzt eine Blutentnahme veranlasst und diese an das neurogenetische Labor der Klinik für Neurologie Marburg gesendet. Das Alter der Kontrollpersonen bei der Blutentnahme wurde vermerkt (*Age at sampling*, AaS).

#### 2.1.1 Patienten-Kontroll-Gruppe 1

Die erste untersuchte Gruppe bestand aus Patienten-Geschwister-Paaren, die schon von Möller et al. beschrieben worden sind (Möller et al., 2006). Sie bestand aus 102 Patienten mit einem EOPD. Davon litten 86 Patienten an einem sporadisch aufgetretenen Parkinson-Syndrom. Bei 16 der Patienten bestand eine familiäre Häufung. Ein familiäres Parkinson-Syndrom wurde angenommen, sobald mindestens ein Verwandter bis einschließlich dem

zweiten Verwandtschaftsgrad ebenfalls erkrankt war. Das durchschnittliche Alter bei Beginn der Erkrankung lag bei 41,4 [19; 50] Jahren. Das Geschlechter Verhältnis (m:w) betrug 1,76:1 (65 Männer und 37 Frauen). Bei den Patienten dieser Gruppe untersuchten wir alle Exone (1—17) des PLA2G6 Gens. Den Patienten dieser Gruppe konnte je ein gesundes Geschwisterkind gegenübergestellt werden. Diese bildeten die erste Kontrollgruppe. Von diesen Geschwistern, waren 55 männlich und 47 weiblich. Daraus ergibt sich ein Geschlechterverhältnis (m:w) von 1,2:1. Das Durchschnittsalter bei der Probeentnahme betrug 52,9 [33; 79] Jahre. In dieser Kontrollgruppe untersuchten wir nur die Exone, bei denen in der ersten Patientengruppe Polymorphismen gefunden wurden (Exon 1, 2, 5, 7, 10 und 17; siehe 3 Ergebnisse). Wurden bei einem Patienten oder einer Kontroll-Person der ersten beiden Gruppen ein Polymorphismus gefunden, wurden, wenn vorhanden, auch die weiteren Geschwister aus unser Datenbank untersucht. Dies waren insgesamt 8 Personen mit einem Durchschnittsalter bei der Blutentnahme von 55,8 [35; 77] Jahren. Bei 5 männlichen und 3 weiblichen Personen betrug das Geschlechterverhältnis (m:w) 1,7:1.

### **2.1.2 Patienten-Kontroll-Gruppe 2**

Die Ergebnisse aus der ersten Patientengruppe und der ersten Kontrollgruppe sollten in einem weiteren Schritt veranschaulicht und bestätigt werden. Hierzu wurde eine weitere EOPD-Gruppe auf ausgesuchte Polymorphismen, die in der ersten EOPD-Gruppe gefunden worden sind, untersucht. Dies betraf die Exone 2, 10 und 17, wobei besondere Aufmerksamkeit auf die Bereiche der SNPs c.-20C/A, c.1381C/T, c.2340C/T und c.2341G/A gelegt wurde. Dieser zweiten EOPD-Gruppe wurde ebenfalls eine Kontroll-Gruppe aus gesunden Personen gegenübergestellt. Die zweite EOPD-Gruppe bestand aus insgesamt 166 EOPD-Patienten, wobei die Parkinson-Krankheit bei 141 Patienten sporadisch auftrat und 25 Patienten von einer familiären Häufung betroffen waren. Das durchschnittliche Alter bei Beginn der Erkrankung (AaO) betrug 42,5 [18;50] Jahre. Die Gruppe setzte sich aus 113 Männern und 53 Frauen zusammen. Das Geschlechterverhältnis (m:w) war demnach 2,13:1. Die zweite Kontrollgruppe bestand aus 155 gesunden Personen, die wie die Personen der

ersten Kontrollgruppe, keine Anzeichen einer Bewegungsstörung zeigten. Das Durchschnittsalter bei der Blutentnahme (AaS) betrug 42,3 [19;83] Jahre. Das Geschlechterverhältnis (m:w) betrug 0,7:1 bei 64 Männern und 91 Frauen. Zwischen den Patienten der zweiten EOPD-Gruppe und den zugehörigen Kontrollen bestand keinerlei Verwandtschaft.

**Tabelle 1: Demographische Daten der EOPD - und Kontrollgruppen**

AaO = Age at onset; AaS = Age at sampling; m = männlich; w = weiblich

	EOPD – Gruppe 1	Kontroll – Gruppe 1	EOPD – Gruppe 2	Kontroll – Gruppe 2
AaO	41,4 [19;50]		42,5 [18;50]	
AaS		52,9 [33;79]		41,7 [12;83]
Personen	102	102	166	155
Geschlecht	m: 65 w:37	m: 55 w:47	m: 113 w: 53	m: 64 w:91

## 2.2 Verwendete Materialien

### 2.2.1 Lösungen und Puffer

- Aqua destillata, Fresenius Kabi AG; Bad Homburg v.d.H., BRD
- TBE-Puffer 10x Stocklösung Ultra Pure™, Invitrogen™; U.K.
- 10x BlueJuice™ Gel Loading Buffer, Invitrogen™; U.K.: 65% (w/v) Sucrose, 10nM Tris-HCL (pH 7,5), 10nM EDTA, 0,3 (w/v) Bromophenol Blue
- Loading Dye (1:4): 100µl 10x BlueJuice™ wurden mit 300µl Aqua destillata verdünnt.
- CYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain, Molecular Probes; USA

### 2.2.2 Gele und DNA-Leiter

- Agarose-Gel 2%: 2g Biozym LE Agarose, Biozym Scientific GmbH auf 100 ml TBE Puffer (1X)
- 100 Bp DNA Leiter (1:50): 10µl Standardlösung, Invitrogen ( 1 µg/µl in 10nM Tris-HCL(pH 7,5) und 1mM EDTA) mit 50µl 10x BlueJuice™ und 440 µl Aqua destillata verdünnt

### 2.2.3. PCR

- PCR-Master-Mix S, PeqLab; Erlangen, Deutschland: 2x konzentrierter PCR-Master-Mix S mit 1,5 u Taq-DNA-Polymerase je 25 µl, 0,4 mM dNTPs, 20mM Tris-HCL (pH 8,8 bei 25°C), 100 mM KCL, 0,02% Tween 20 und 3 mM MgCl<sub>2</sub>
- Primer [Startkonzentration 10 pmol/µl]: je 5µl für forward und reverse
- Genomische DNA [Startkonzentration 20 µg/ml]: 1µl

### 2.2.4. Sequencing

- QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN; Hilden, Deutschland
- Big Dye® Terminator v1.1 Cycle sequencing Kit, Applied Biosystems®; Foster City USA
- Centri-Sep Säulen, Princeton Separations®; New Jersey, USA
- POP-6 Gel mit 10xPuffer mit EDTA für den Sequenzer, Applied Biosystems®; Foster City USA
- ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer; Applied Biosystems®; Foster City, USA
- ABI PRISM™ 310 Collection Software 2.0 (für Macintosh OS 8); Applied Biosystems®; Foster, City USA
- Sequencing Analysis Software 3.4.1 (für Macintosh OS 8), Applied Biosystems®; Foster, City USA
- Sequence Scanner Software v1.0 (für Windows), Applied Biosystems®; Foster, City USA

### 2.2.5 Primer

In Anlehnung an Morgan et al. (Morgan et al., 2006) entwarfen wir *forward* und *reverse* Primer für die Exone 1—17. Alle verwendeten Primer wurden von der Firma MWG- Biotech AG, Ebersberg, bezogen.

**Exon 1 – Annealing-Temperatur: 61°C**

- Forward 5'-GAC AGG GCC ACC AGT GAT TG-3'
- Reverse 5'-AGT TCG AGA TGA GAC ACG GGC- 3'

**Exon 2 – Annealing-Temperatur: 58°C**

- Forward 5'-CAG GAT CTG GGG ACA ACG C- 3'
- Reverse 5'-GCC AAT AAG ACC TCC AAT CC- 3'

**Exon 3 – Annealing-Temperatur: 60°C**

- Forward 5'-GGG ACC TTC TGA TTC CAG C- 3'
- Reverse 5'-GCC CAC ACA AGC AGG TAC AC- 3'

**Exon 4 – Annealing-Temperatur: 59°C**

- Forward 5'-AAA GTC CAG GTT TCC GAG TG- 3'
- Reverse 5'-AGG CCT GAG AGT GAC ACC TG- 3'

**Exon 5 – Annealing-Temperatur: 59°C**

- Forward 5'-CCC GGC CTC TTT ACG TTC- 3'
- Reverse 5'-CCC GGC CTC TTT ACG TTC- 3'

**Exon 6 – Annealing-Temperatur: 57°C**

- Forward 5'-CTT CAT CCC ACG CCA CG- 3'
- Reverse 5'-CTT CAT CCC ACG CCA CG- 3'

**Exon 7 – Annealing-Temperatur: 59°C**

- Forward 5'-CTT CAT CCC ACG CCA CG- 3'
- Reverse 5'-GAC AGC CCT CCT GCA TTC- 3'

**Exon 8 – Annealing-Temperatur: 59°C**

- Forward 5'-GAC AGC CCT CCT GCA TTC- 3'
- Reverse 5'-CTC GGT CCC TGT ATC CAC C- 3'

**Exon 9 – Annealing-Temperatur: 61°C**

- Forward 5'-AGC TGC TTG GGA TGT ACC AGC- 3'
- Reverse 5'-CGG CTT CCT TTA GTG ACT TCC G- 3'

**Exon 10 – Annealing-Temperatur: 60°C**

- Forward 5'-CTA GGG ACC TCT GGG GTA GC- 3'
- Reverse 5'-GTG AGG GGC AGG AAA GC- 3'

**Exon 11 – Annealing-Temperatur: 58°C**

- Forward 5'-AAA GTA CTG GGC TGT GGC AG- 3'
- Reverse 5'-GCA AAG CCC TGA AGA CAA AC- 3'

**Exon 12 – Annealing-Temperatur: 60°C**

- Forward 5'-AAT TTG GGT TTG CTT AGG CCT C- 3'
- Reverse 5'-GTT CCC TCT GCT CCC CTC AAG- 3'

**Exon 13 – Annealing-Temperatur: 56°C**

- Forward 5'-AAT TGT GGG GAA AGG GAA AG- 3'
- Reverse 5'-ACC ACC CAA CAG CTT CTC- 3'

**Exon 14 – Annealing-Temperatur: 59°C**

- Forward 5'-CAT GGG TTT TAT GCC AGT CC- 3'
- Reverse 5'-GTC CCT AGC ATG GTT TGC TG- 3'

**Exon 15 – Annealing-Temperatur: 59°C**

- Forward 5'-CCC CAG AGC CCA GTC TTG- 3'
- Reverse 5'-GTC TCC TCC AAC ACC AAA GG- 3'

**Exon 16 – Annealing-Temperatur: 63°C**

- Forward 5'-GCT CCG AGA CTG CAG GG- 3'
- Reverse 5'-AGT CCG ACC ACG CCA GGG- 3'

**Exon 17 – Annealing-Temperatur: 59°C**

- Forward 5'-TGC CCA GCC TGA GCA TCC- 3'
- Reverse 5'-GCA GGG GCT GAA TGG AC- 3'

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Präparation der genomischen DNA

Die genomische DNA wurde aus Vollblut extrahiert. Hierfür wurde ein Nucleon BACC 3-Kit für Blut- und Zellkulturen der Firma Amersham Biosciences, Freiburg, verwendet (Inhalt: Reagenz A, Reagenz B, Natrium-Perchlorat, Silica, Chloroform, Ethanol absolut). Hierfür wurden 3–10 ml EDTA-Vollblut mit der Reagenz A auf 40 ml aufgefüllt, 5 Minuten inkubiert und weitere 5 Minuten bei 1300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 2 ml Reagenz B resuspendiert, mit 400µl Natrium-Perchlorat versetzt und kurz gemischt. Hiernach wurden 2ml Chloroform hinzugefügt. Die Lösung wurde 10 Minuten inkubiert und danach 2 Minuten bei 900 g zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen, mit 200 µl Silica tropfenweise resuspendiert und erneut 4 Minuten bei 1300 g zentrifugiert. Mit kalten Ethanol wurde der

Überstand ausgefällt und in 500 µl 1xTBE-Puffer (Invitrogen<sup>TM</sup>; U.K.) gelöst. Mit einem Photometer (Gen Quat Pro) wurde die Menge und die Reinheit der DNA überprüft (Sambrook, 1989). Anschließend wurde die DNA für die PCR auf 20 µg/ml mit Aqua destillata (Fresenius Kabi AG, Bad Homburg v.d.H.) verdünnt.

### 2.3.2 Standard-PCR

Um aus der gewonnenen DNA die gewünschten DNA-Sequenzen zu extrahieren bzw. sie zu vervielfältigen nutzten wir eine Standard-PCR. Hierbei handelt es sich um eine DNA-Polymerase-Ketten-Reaktion (*Polymerase-chain-reaction, PCR*), die erstmals von Saiki et al. beschrieben worden ist (Saiki et al., 1985). Kary Mullis erhielt für die Idee dieses Verfahrens 1993 schließlich den Nobelpreis für Chemie. Mit dieser Methode ist es möglich aus einem kompletten DNA-Strang einen beliebigen, bekannten Abschnitt zu vermehren. Hierzu werden keine Restriktionsenzyme, Vektoren oder Wirtszellen, wie in anderen Verfahren, benötigt. Sie besteht aus der zu vervielfältigen DNA, thermostabilen DNA-Polymerasen, Oligonukleotid-Primern und freien Nukleotiden. Alles wurde in einer speziellen Pufferlösung angesetzt, um eine optimale Umgebung für die chemischen Reaktionen zu bilden. In einem PCR-Zyklus liefen nacheinander immer 3 Schritte ab:

**1. Denaturierung:** Bei Erhitzen der Proben auf 94 °C wurden die Wasserstoffbrückenbindungen gelöst und die DNA-Stränge somit getrennt.

**2. Annealing:** Beim Absenken auf die primer-spezifische Annealing-Temperatur (siehe [Primer 2.2.5](#)) kam es zur Hybridisierung der im Überschuss vorhandenen Oligonukleotid-Primern an die aufgetrennten DNA-Stränge

**3. Elongation:** Bei erneutem Erhöhen der Temperatur auf 72 °C banden die thermostabilen DNA-Polymerasen an die einzelnen DNA-Stränge und synthetisieren einen neuen DNA-Strang in 3'-5'-Richtung. Die vorliegende DNA wurde somit verdoppelt. Diese Zyklen aus Denaturierung, Annealing und Elongation wurden nacheinander wiederholt. Nach zwei Zyklen entstanden so die ersten DNA-Sequenzen in der gewünschten Größe. Durch das bis zu 35malige Wiederholen des obigen Zyklus wurden die nötigen DNA-Mengen

erhalten. Am Ende des letzten Zyklus schloss sich eine Abkühlungsphase an. Hierbei wurde die Probe auf 4 °C abgekühlt.

Wir verwendeten hierfür den PCR-Master-Mix S (PeqLab, Erlangen). Von dem Reaktionsgemisch des PCR-Mastermix wurden 12,5 µl mit je 0,5 µl *forward*- und *reverse*-Primer vermennt und anschließend mit 10,5 µl HPLC-Wasser auf 24 µl aufgefüllt. Hierzu gaben wir je 1 µl der zu untersuchenden DNA (20 µg/ml). Das fertige Reaktionsgemisch wurde nun auf einen Peltier Thermal Cycler PTC-200 (MJ-Research, USA) gegeben.

### 2.3.3 Gel-Elektrophorese

Nach der PCR und auch nach der sich anschließenden QIAquick-Aufreinigung (s.u.) wurden die Endprodukte der jeweiligen Schritte stichprobenartig auf ihre Reinheit überprüft. Wir nutzten eine Gel-Elektrophorese und stellten hierfür ein 2%iges Agarose-Gel her. In die beiden äußeren Fülltaschen wurden je 7µl eines 100Bp DNA-Leiters (1:50, Invitrogen, U.K.) gegeben. In die restlichen Taschen gaben wir je 5 µl des zu untersuchenden Reaktionsgemisches und 2 µl Loading Dye (1:4). Um das Resultat für die Kamera deutlich zu machen, wurde das Gemisch mit SYBR-Gold Nucleic Acid Gel Stain (Molecular Probes; USA) angefärbt. In der Elektrophorese wurde über ca. 2 Stunden eine Spannung von 100 V angelegt. Danach wurde das Resultat unter einer E.A.S.Y. 429K Kamera (Herolab, BRD) betrachtet.

### 2.3.4 Aufbereitung der PCR-Produkte

Um die durch die PCR erhaltenen DNA-Proben aufzubereiten und letztendlich die Nukleotidsequenzen der einzelnen Exone auf einem Sequenzer zu veranschaulichen, waren verschiedene Schritte erforderlich. Für diese Studie arbeiteten wir mit einer QIAquick-Aufreinigung und dem Cycle-Sequencing in Verbindung mit einer Centrisep-Aufreinigung.

#### QIAquick-Aufreinigung

Hierbei band die zu reinigende DNA, unter optimalem pH-Wert, an eine spezielle Membran in den Qiaquick-Zentrifugationssäulen. Danach wurden die überflüssigen Bestandteile der Probe ausgewaschen. Die Aufreinigung wurde mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits (QIAGEN, Hilden) durchgeführt.



Alle Schritte führten wir nach der genauen Anleitung der jeweiligen Hersteller durch.

### **Cycle-Sequencing-PCR**

Um die DNA-Sequenz später mit einem automatischen Sequenzer kenntlich zu machen, mussten die einzelnen Nukleotide mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden. Wir verwendeten hierfür eine Cycle-Sequencing-PCR mit dem BigDye R Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems®, USA). Von der QIAquick-aufbereiteten DNA wurden 3 µl mit 1 µl der Exon spezifischen Primer (forward oder reverse; siehe 2.2.5) und mit 3 µl des BigDye Terminator Cycle-Sequencing-Kit versetzt. Nun wurde mit 3 µl HPLC-Wasser auf 10 µl Reaktionsgemisch aufgefüllt. Dies Gemisch wurde auf dem Peltier Thermal Cycler (PTC-200) für eine Minute bei 95 °C denaturiert. Anschließend folgte das Cycle Sequencing, bestehend aus 25 Zyklen einer 10-sekündigen Denaturierung bei 96 °C, einem 5-sekündigen Annealing bei 55 °C, sowie einer 4-minütigen Elongation bei 60 °C. Im BigDye Reaktionsgemisch sind alle vier Desoxyribonukleotid-Triphosphate (dNTPs) und die Didesoxyribonukleotid-Triphosphate (ddNTPs), fluoreszenzmarkiert mit vier verschiedenen Farbstoffen, Puffer, sowie die hitzebeständige DNA-Polymerase enthalten. Den ddNTPs fehlen die 3'-OH-Gruppen, so dass es nach dem Einbauen eines farbstoffmarkierten ddNTPs zu einem Abbruch der Elongationsreaktion kommt. Nach dem Cycle Sequencing sind im Ansatz nun verschieden lange DNA-Stränge mit dem selben 5'-Ende, jedoch unterschiedlichen 3'-Ende.

### **Centrisep-Aufreinigung**

Für die weitere Aufbereitung wurden die Cycle-Sequencing-Produkte mit Centri-Sep-Säulen (Princeton Separations®, USA) gefiltert. Als erstes wurden 800µl HPLC-Wasser auf die Säulen gegeben und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit abgelassen und die Säule für 2 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Nun wurde 10µl des Reaktionsansatzes aus der Cycle-Sequencing-PCR auf die Säulen gegeben und erneut für 2 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Das so erhaltene Reaktionsgemisch wurde nun sequenziert.

### 2.3.5 Sequenzierung

Das Sequenzieren der aufbereiteten DNA-Proben diente der Darstellung der zu untersuchenden Nukleotid-Sequenz. Die Matrize der unterschiedlich langen, mit Fluoreszenzfarbstoffen gekennzeichneten, DNA-Stränge aus dem Cycle Sequencing bewegten sich hierbei elektrokinetisch getrieben durch den Sequenzer. Die DNA-Fragmente liefen der Größe nach und wurden durch die angehängten Fluoreszenzfarbstoffe am 3'-Ende erkannt. Das Ergebnis wurde sowohl als reine Buchstaben-Sequenz der Nukleotide (A für Adenosin, C für Cytosin, G für Guanin und T für Thymin), als auch in Form eines vierfarbigen Ausdrucks ausgegeben (siehe Abbildungen 1—11). Hier wurde jeder Base eine Farbe zugeordnet. Für das Sequenzieren aller Proben dieser Studie benutzten wir einen ABI PRISMTM310 Genetic Analyzer. Zur Auswertung und graphischen Darstellung der Daten des Sequenzers benutzten wir die ABI PRISM™ Sequencing Analysis 3.4.1 Software (für Macintosh OS 8) und die Sequence Scanner Software v1.0 (für Windows) der Firma Applied Biosystems®. Die so erhaltenen Nukleotid-Sequenzen der einzelnen Exone wurden nun auf Polymorphismen untersucht. Hierzu verglichen wir sie mit dem menschlichen Genom aus einer genetischen Datenbank. Dies geschah sowohl elektronisch wie auch manuell. Für die elektronische Gegenüberstellung nutzten wir ein BLAST-Programm welches die eingespeisten Nukleotid-Sequenzen mit dem Genom der Datenbank vergleicht und Polymorphismen veranschaulicht. Für alle Sequenzen dieser Studie wurde das *nucleotid-BLAST* Programm des NCBI verwendet (Nucleotide-Blast). Verglichen wurden die Sequenzen mit der genomischen Datenbank des NCBI. Zusätzlich untersuchten wir die Ausdrücke des Sequenzers manuell um gezielt heterozygote Mutationen auffindig zu machen, die teils durch das verwendete BLAST-Programm nicht aufgedeckt wurden.

### 2.3.6 Auswertung und Benennung der Polymorphismen

Die gefundenen Polymorphismen wurden mit der SNP-Datenbank des NCBI (dbSNP; Gene ID: 8398) verglichen, um schon beschriebenen Polymorphismen zu erkennen (dbSNP, 2010). Beim Beschreiben der genauen Position der Polymorphismen im untersuchten Protein nahmen wir Bezug auf die sequence-accession Nummern des NCBI. Die Position auf der Nukleotid-Sequenz der

mRNA wurde nach der sequence-accession Nummer NM\_003560.2 benannt. Für die Position in der Aminosäure-Sequenz wurde die Nummer NP\_003551.2 verwendet. Da in der internationalen Literatur die 5'UTR in der Benennung von Polymorphismen nicht mitgezählt wird, wählten auch wir das erste Nukleotid der proteincodierenden Sequenz als Nukleotid 1. Dies entspricht der Position 137 der Sequenz NM\_003560.2k.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Patienten-Kontroll-Gruppe 1

Die erste Patienten- und Kontroll-Gruppe bestand, wie oben beschrieben aus 102 EOPD-Patienten und den jeweiligen gesunden Geschwistern. In der Patienten Gruppe fanden wir 10 verschiedene Polymorphismen in der Nukleotid-Sequenz des PLA2G6 Gens (siehe Tabelle 2). Diese Mutationen traten bei 16 der 102 Patienten auf (15,6%). Bei allen Mutationen handelte es sich um heterozygote single-nucleotid-polymorphismen (SNP), die wir auf sechs verschiedenen Exonen (1, 2, 5, 7, 10 und 17) lokalisierten. Betroffen von den Polymorphismen war neben der kodierenden Region (Exon 2 - 17) auch die 5'-untranslatierte Region (engl. *5'-untranslated-region* = 5'UTR; Exon 1 + 2). Von den 10 gefundenen Polymorphismen fielen zwei in die 5'-UTR. Bei den acht SNPs in der kodierenden Region, handelte es sich um fünf synonyme, stumme Mutationen und drei nicht-synonyme, s.g. Missense-Mutationen.

Von den gesamten 10 Mutationen waren 5 bereits in der SNP-Datenbank des NCBI gelistet (dbSNP-Nr.: rs11570597, rs2267369, rs11570679, rs11570680 und rs76718524; s.u.).

Die von den Polymorphismen betroffenen sechs Exone wurden in der ersten Kontroll-Population ebenfalls auf Mutationen untersucht. Von den insgesamt 10 Polymorphismen aus der Patienten-Gruppe wurden 7 auch in der Gruppe der gesunden Geschwister nachgewiesen. Von diesen 7 Mutationen waren insgesamt 22 Kontrollpersonen betroffen. Die vier Mutationen, die nur in der Gruppe mit EOPD-Patienten auftraten, wurden bei je einem Patienten nachgewiesen. Hierzu gehören die drei synonymen Polymorphismen c.756C>T im Exon 5 (siehe 3.1.4), c.957G>A im Exon 7 (siehe 3.1.5). Die vierte Mutation, die nur in der Patienten-Gruppe nachgewiesen wurde, ist der nichtsynonyme c.2341G>A Polymorphismus im Exon 17 (siehe 3.1.10).

**Tabelle 2: Polymorphismen im PLA2G6 Gen in der Patienten-Kontroll-Gruppe 1**
<sup>1</sup> Die Position auf der mRNA (NCBI: accession number NM\_003560)  
<sup>2</sup> Die Position und Aminosäure auf Proteinebene (NCBI: accession number NP\_003551)  
<sup>3</sup> Nummer in der dbSNP Datenbank des NCBI; <sup>4</sup> Alter bei Beginn der Erkrankung  
<sup>5</sup> Gesunde Kontrollpersonen inkl. vorhandene zusätzlicher Geschwister  
<sup>6</sup> Alter bei der Blutentnahme;

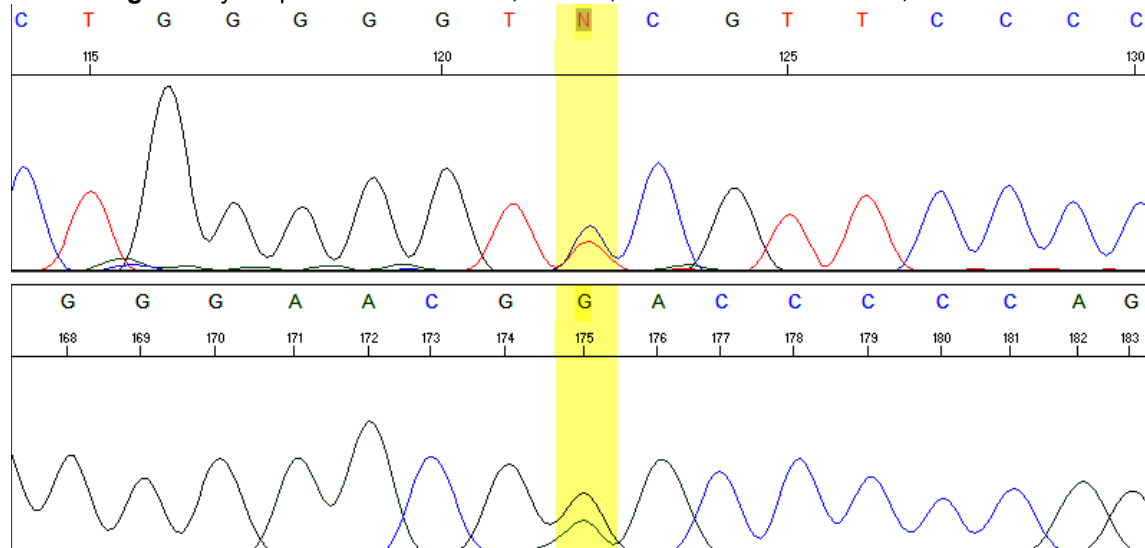
Mutation <sup>1</sup>	Exon	Resultat <sup>2</sup>	dbSNP <sup>3</sup>	Patienten	AaO <sup>4</sup>	Kontrollen <sup>5</sup>	AaS <sup>6</sup>
-130C>T	1	( 5'-UTR )	rs11570597	n = 2	37 / 50	n = 3	51 - 57
-20C>A	2	( 5'-UTR )	-	n = 1	40	n = 1	53
87A>G	2	V29V	rs2267369	n = 5	30 - 48	n = 6	41 - 62
756C>T	5	N252N	rs771809118	n = 1	46	-	-
957G>A	7	T319T	rs11570679	n = 1	48	-	-
966C>T	7	H322H	-	n = 1	50	n = 1	44
1027G>A	7	A343T	rs11570680	n = 2	41 / 44	n = 8	39 - 74
1381C>T	10	R461W	rs76718524	n = 1	40	n = 1	42
2340C>T	17	N780N	-	n = 1	29	n = 2	38 / 49
2341G>A	17	A781T	rs139093920	n = 1	30	-	-

### 3.1.1 c.-130C>T Polymorphismus; rs11570597; Exon 1; 5'UTR

Der c.-130C>T Polymorphismus (siehe Abbildung 1) in der 5'-UTR wurde bei zwei Patienten (16209 und 16622) der ersten Patienten-Kontroll-Gruppe nachgewiesen. Die ersten Symptome eines EOPD wurde bei Patient 16209 im Alter von 37 Jahren festgestellt (AaO = 37 Jahre). Der gesunde Verwandte (21299, AaS = 44 Jahre) zeigte den Polymorphismus nicht. Bei Patient 16622 (AaO = 50 Jahre) wurde der Polymorphismus sowohl beim erkrankten Patienten, als auch bei dem gesunden Geschwisterkind (15753, AaS = 56 Jahre) gefunden. Zusätzlich wurde der c.-130C>T SNP bei zwei weiteren gesunden Kontrollpersonen (20235, AaS = 51 Jahre und 15737, AaS = 57 Jahre) nachgewiesen. Die verwandten EOPD – Patienten dieser gesunden Probanden (17920, AaO = 50 Jahre und 16490, AaO = 29 Jahre) waren jedoch nicht von dem Polymorphismus betroffen. In der dbSNP Datenbank des NCBI war dieser Polymorphismus bereits unter der Nummer rs 11570597 gelistet. Die

Heterozygotenfrequenz liegt bei 0,01, ein klinischer Zusammenhang ist derzeit unbekannt.

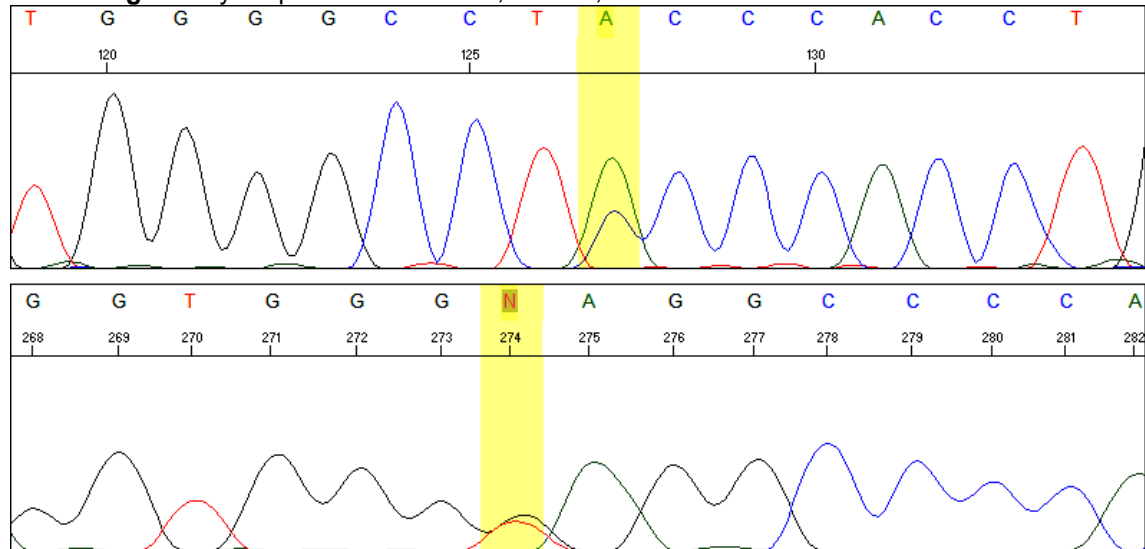
**Abbildung 1:** Polymorphismus c.-130C>T; Exon 1; dbSNP-Nr. rs11570597; Patient 16209



Oben: Forward in 5' - 3'Richtung; Unten: Reverse in 5' - 3'Richtung  
A = Adenosin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin, N = Auffällig

### 3.1.2 c.-20C>A Polymorphismus; Exon 2; 5'-UTR

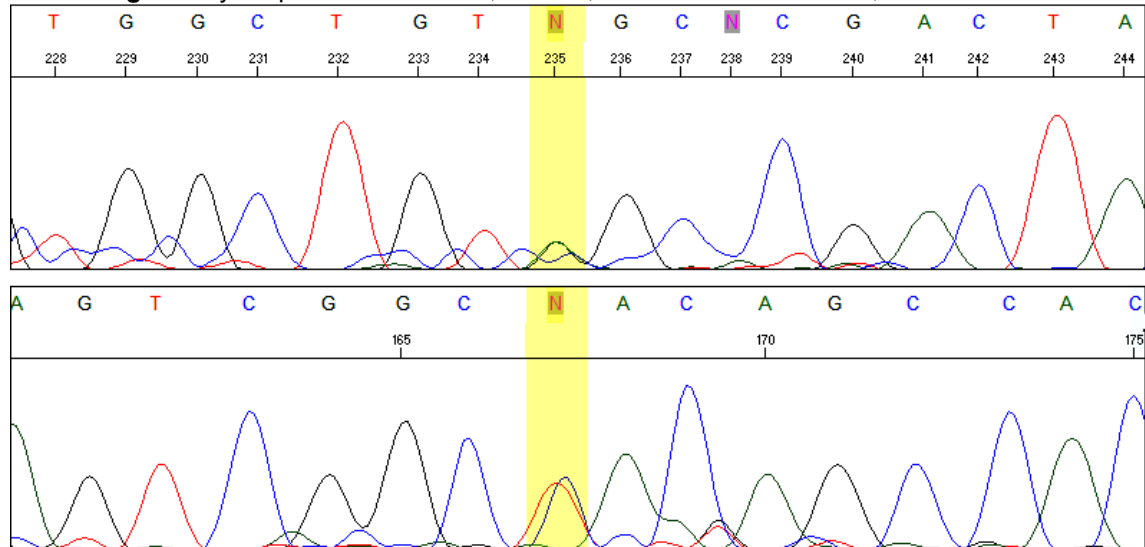
Den c.-20C>A Polymorphismus (siehe Abbildung 2) wiesen wir bei Patient 13834 (AaO = 40 Jahre) nach. Das Geschwisterkind aus der Kontrollgruppe (15642, AaS = 55 Jahre) zeigte den Polymorphismus nicht, jedoch trat er im zusätzlich untersuchten Verwandten (15628, AaS = 53 Jahre) auf. Dieser Polymorphismus wurde bisher in keiner der untersuchten dbSNP Datenbanken beschrieben.

**Abbildung 2:** Polymorphismus c.-20C>A; Exon 2; Patient 13834

Oben: Forward in 5' - 3'Richtung; Unten: Reverse in 5' - 3'Richtung  
 A = Adenosin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin, N = Auffällig

### 3.1.3 c.87G>A Polymorphismus; rs2267369; Exon 2

Im Exon 2 Bereich der kodierenden Region wurde der c.87G>A Polymorphismus (siehe Abbildung 3) bei insgesamt 5 Patienten aus der Original-Population und 6 Kontrollpersonen gefunden. Bei diesem Polymorphismus handelt es sich um einen synonymen SNP der bereits unter der Nummer rs2267369 in der Datenbank des NCBI gelistet ist. Die Heterozygotenfrequenz liegt nach der Datenbank bei 0,16. Wir konnten den Polymorphismus gleich in 3 Geschwister-Paaren (Patient 17687, AaO = 48 Jahre + Kontrolle 17658, AaS = 62 Jahre; Patient 19550, AaO = 37 Jahre + Kontrolle 20249, AaS = 41 Jahre; Patient 13542, AaO = 34 Jahre + Kontrolle 16257, AaS = 48 Jahre) nachweisen. Gleichzeitig fanden wir ihn auch separat in 2 EOPD – Patienten (15442, AaO = 48 Jahre und 20787, AaO = 30 Jahre) und 3 gesunden Personen (20010, AaS = 62 Jahre; 16349, AaS = 58 Jahre und 21516, AaS = 53 Jahre) aus der Kontrollgruppe. Die jeweiligen verwandten Patienten bzw. Kontrollpersonen waren von dem SNP nicht betroffen.

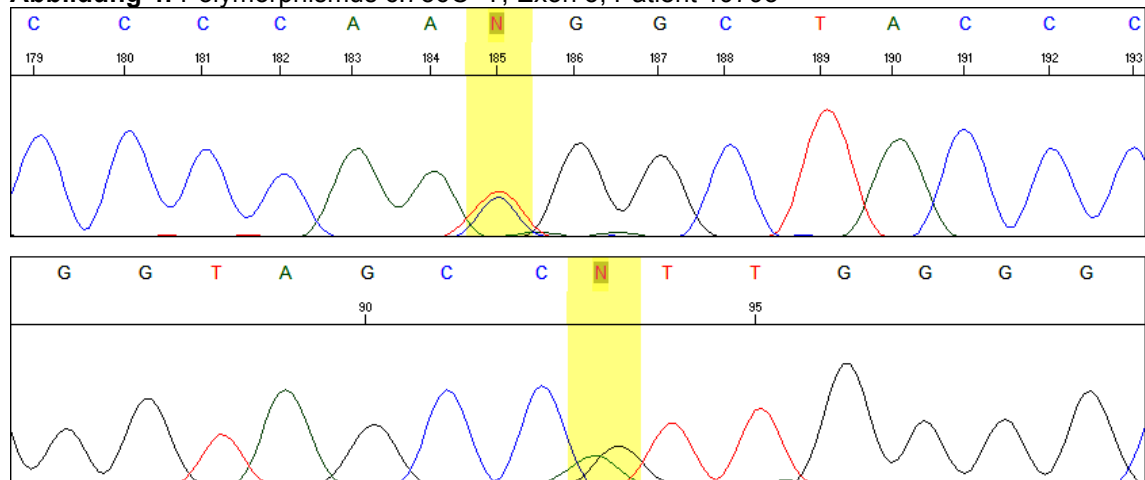
**Abbildung 3:** Polymorphismus c.87G>A; Exon 2; dbSNP-Nr. rs2267369; Patient 19550

Oben: Forward in 5'-3' Richtung; Unten: Reverse in 5'-3' Richtung

A = Adenosin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin, N = Auffällig

### 3.1.4 c.756C>T Polymorphismus; Exon 5

Der synonyme Polymorphismus an Position 756 der Nukleotid-Sequenz in Exon 5 wurde nur bei Patient 19793 (AaO = 46) nachgewiesen (siehe Abbildung 4). Die Verwandten von dem betroffenen Patienten und die restlichen Kontrollpersonen wiesen den Polymorphismus nicht auf. Der c.756C/T SNP war in den durchsuchten dbSNP Datenbanken nicht gelistet. Seit der Veröffentlichung ist er mittlerweile unter der Nummer rs771809118 in der SNP-Datenbank gelistet.

**Abbildung 4:** Polymorphismus c.756C>T; Exon 5; Patient 19793

Oben: Forward in 5'-3' Richtung; Unten: Reverse in 5'-3' Richtung

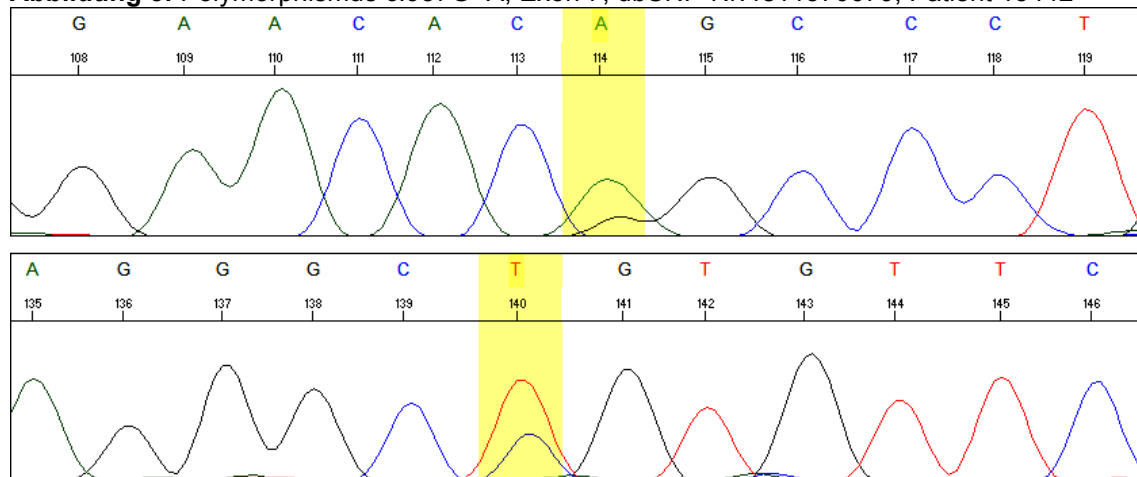
A = Adenosin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin, N = Auffällig



### 3.1.5 c.957G>A Polymorphismus; rs11570679; Exon 7

Der synonyme Polymorphismus an Position 957 der Nukleotid-Sequenz in Exon 7 wurde nur bei Patient 15442 (AaO = 48) nachgewiesen. Die Verwandten von dem betroffenen Patienten und die restlichen Kontrollpersonen wiesen den Polymorphismus nicht auf. In der dbSNP Datenbank des NCBI war dieser Polymorphismus bereits unter der Nummer rs11570679 gelistet. Die Heterozygotenfrequenz liegt bei ca. 0,13, ein klinischer Zusammenhang ist derzeit unbekannt.

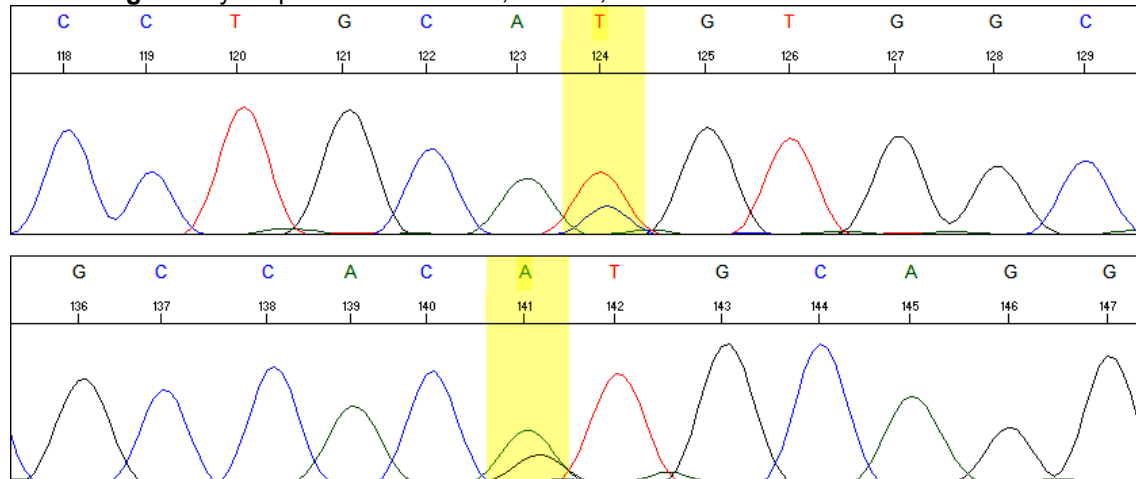
**Abbildung 5:** Polymorphismus c.957G>A; Exon 7; dbSNP-Nr. rs11570679; Patient 15442



Oben: Forward in 5'-3' Richtung; Unten: Reverse in 5'-3' Richtung  
A = Adenosin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin, N = Auffällig

### 3.1.6 c.966C>T Polymorphismus; Exon 7

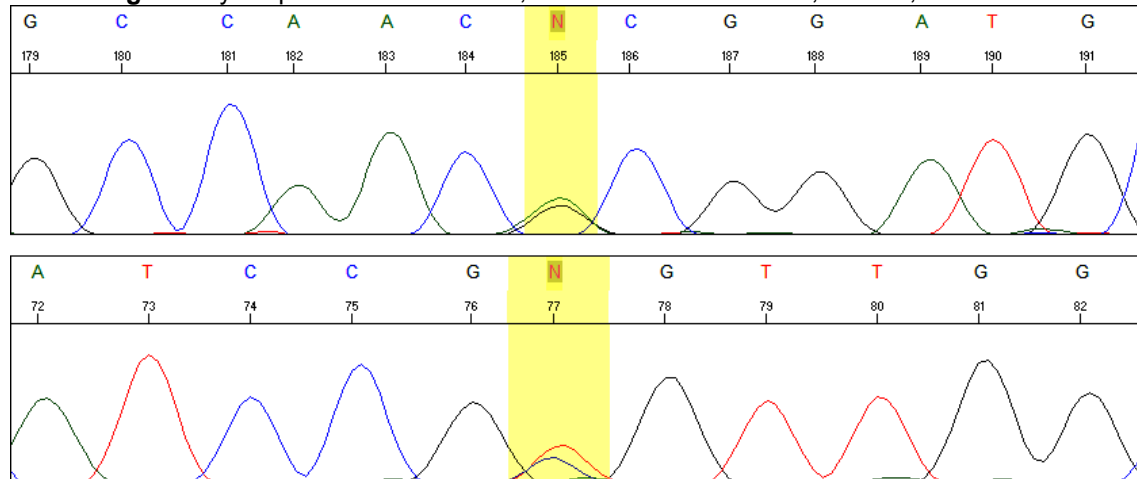
Patient 14482 (AaO = 50 Jahre) wies in Exon 7 den synonymen Polymorphismus c.966C>T auf (siehe Abbildung 6). Diese Mutation wurde ebenfalls bei der gesunden Schwester des Patienten (16058; AaS = 44 Jahre) nachgewiesen. Die Mutation war in der Datenbank des NCBI noch nicht gelistet.

**Abbildung 6:** Polymorphismus c.966C>T; Exon 7; Patient 14482

Oben: Forward in 5'-3' Richtung; Unten: Reverse in 5'-3' Richtung  
 A = Adenosin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin, N = Auffällig

### 3.1.7 c.1027G>A Polymorphismus; rs11570680; Exon 7

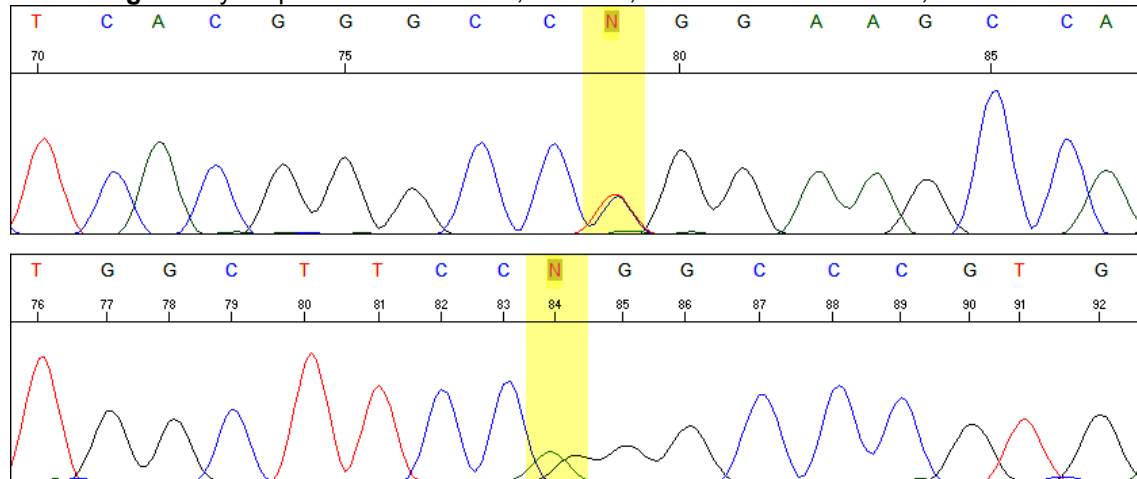
Der nicht-synonyme SNP an Position 1027 der Nukleotidsequenz (siehe Abbildung 7) führt durch einen möglichen Austausch von Guanin durch Adenosin an Position 1 des Codons zu einer fehlerhaften Translation. Hieraus resultiert der Austausch der Aminosäure Alanin an Position 343 der Aminosäure Threonin (p.A343T). Diese Mutation war bereits im NCBI unter der Nummer rs11570680 mit einer Heterozygotenfrequenz von 0.012 geführt. Ein klinischer Zusammenhang ist nicht bekannt. Wir haben diese Mutation in 2 Patienten der ersten Gruppe mit einem EOPD gefunden. Bei Patient 10878 (AaO = 44 Jahre) waren alle vier untersuchten Geschwister (15519, AaS = 65 Jahre; 15528, AaS = 65 Jahre; 15622, AaS = 74 Jahre; 15658, AaS = 69 Jahre) ebenfalls von dem gleichen heterozygoten SNP betroffen. Patient 18821 (AaO = 41 Jahre) zeigte ebenso wie das einzige Geschwisterkind (20219, AaS = 36 Jahre) die Mutation. Zusätzlich zu den Verwandten der betroffenen Patienten konnte der SNP auch bei drei weiteren gesunden Kontrollpersonen nachgewiesen werden (16198, AaS = 49 Jahre; 16252, AaS = 40 Jahre; 16259, AaS = 54 Jahre). Die verwandten Patienten dieser drei Personen (Patienten 15874, AaO = 30m; 13102, AaO = 32m; 17819, AaO = 32w) waren alle nicht von dem Polymorphismus betroffen.

**Abbildung 7:** Polymorphismus c.1027G>A; dbSNP-Nr. rs11570680; Exon 7; Patient 10878

Oben: Forward in 5'- 3' Richtung; Unten: Reverse in 5'- 3' Richtung  
 A = Adenosin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin, N = Auffällig

### 3.1.8 c.1381C>T Polymorphismus; rs76718524; Exon 10

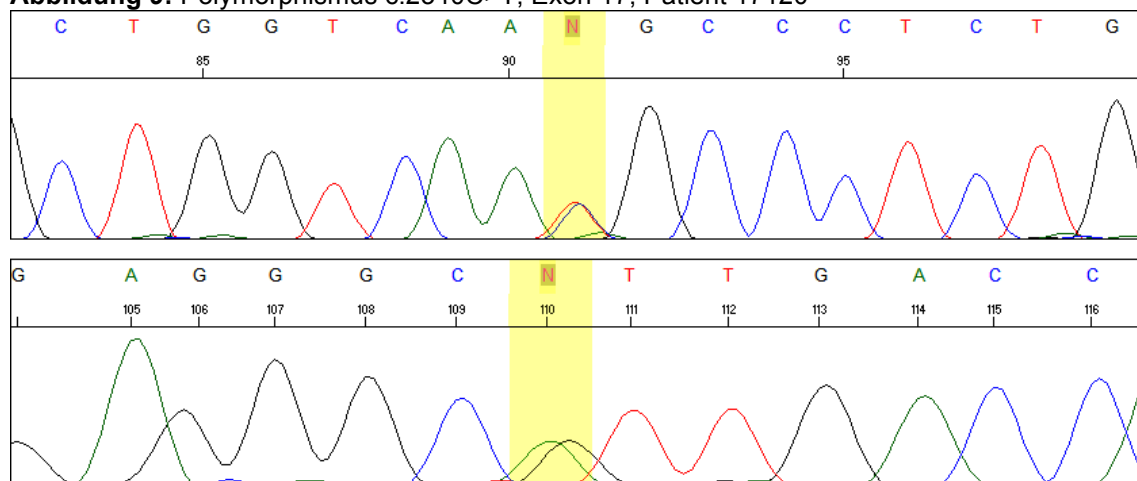
Der nicht-synonyme SNP an Position 1381 der Nukleotidsequenz führt durch einen möglichen Austausch von Cytosin durch Thymin an Position 1 des Codons zu einer fehlerhaften Translation. Hieraus resultiert der Austausch der Aminosäure Arginin an Position 461 zu der Aminosäure Tryptophan (p.R461W). Diese Mutation war bereits im NCBI unter der Nummer rs76718524 gelistet. Eine genaue Heterozygotenfrequenz oder ein klinischer Zusammenhang sind derzeit nicht bekannt. In unserer Untersuchung wurde dieser Polymorphismus (siehe Abbildung 8) bei einem Patienten mit EOPD gefunden (14732, AaO = 40 Jahre) gefunden. Von den drei Geschwistern des Patienten wies ein Bruder (16205, AaS = 42) die gleiche Mutation auf. Die anderen Geschwister (16201, AaS = 65 Jahre; 16444, AaS = 56 Jahre) waren nicht von dem Polymorphismus betroffen.

**Abbildung 8:** Polymorphismus c.1381C>T; Exon 10; dbSNP-Nr. rs76718524; Patient 14732

Oben: Forward in 5'-3' Richtung; Unten: Reverse in 5'-3' Richtung  
 A = Adenosin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin, N = Auffällig

### 3.1.9 c.2340C>T Polymorphismus; Exon 17

An Position 2340 der kodierenden Nukleotidsequenz fanden wir den synonymen heterozygoten SNP c.2476C/T bei einem Patienten mit einem EOPD der ersten Patientengruppe (siehe Abbildung 9). Bei dem Patient 17120 wurde im Alter von 29 Jahren die ersten Symptome bemerkt (AaO = 29 Jahre). Ebenfalls betroffen waren das einzige Geschwisterkind 20104 (AaS = 38 Jahre) und eine nichtverwandte gesunde Kontrollperson (16198, AaS = 49 Jahre). Der Polymorphismus war in der dbSNP Datenbank noch nicht gelistet.

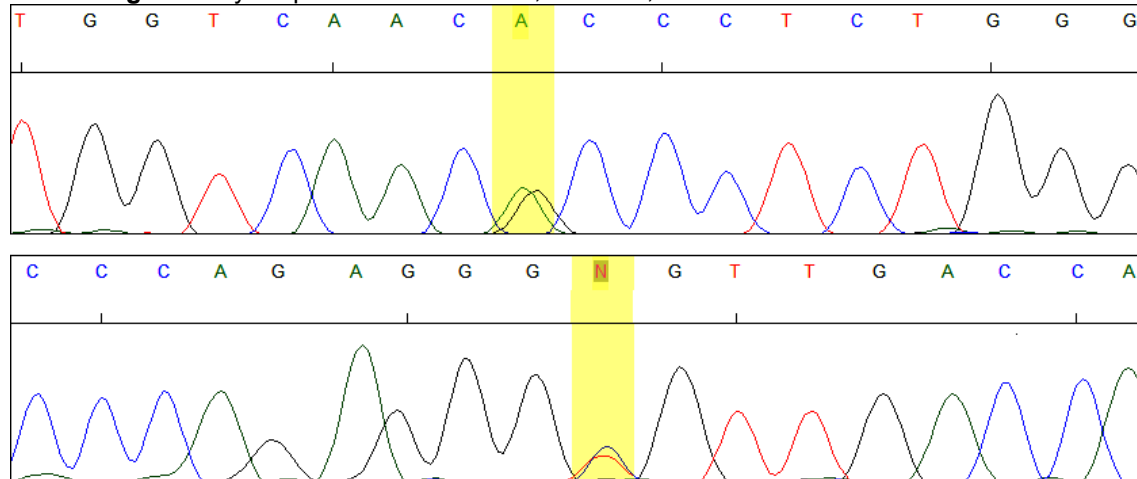
**Abbildung 9:** Polymorphismus c.2340C>T; Exon 17; Patient 17120

Oben: Forward in 5'-3' Richtung; Unten: Reverse in 5'-3' Richtung  
 A = Adenosin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin, N = Auffällig

### 3.1.10 c.2341G>A Polymorphismus, Exon 17

Der EOPD – Patient 15874 (AaO = 30 Jahre) war von diesem nicht-synonymen SNP an Position 2341 der Nukleotidsequenz betroffen (siehe Abbildung 10). Der Polymorphismus führt durch einen möglichen Austausch von Guanin durch Adenosin an Position 1 des Codons zu einer fehlerhaften Translation. Hieraus resultiert der Austausch der Aminosäure Alanin an Position 781 zu der Aminosäure Threonin (p.A781T). Diesen SNP konnten wir weder bei den gesunden Geschwistern des betroffenen Patienten noch bei den anderen nichtverwandten Kontrollpersonen nachweisen. Auch in der dbSNP Datenbank des NCBI war die Mutation nicht aufgeführt. Mittlerweile ist der Polymorphismus unter der Nummer rs139093920 gelistet.

**Abbildung 10:** Polymorphismus c.2341G>A; Exon 17; Patient 15874



Oben: Forward in 5'- 3' Richtung; Unten: Reverse in 5'- 3' Richtung  
A = Adenosin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin, N = Auffällig

## 3.2 Patienten-Kontroll-Gruppe 2

Die zweite Patienten-Kontroll-Gruppe bestand aus insgesamt 166 EOPD-Patienten und 155 nicht verwandten, gesunden Kontrollpersonen. Diese Gruppe untersuchten wir auf ausgesuchte Polymorphismen, die in der ersten Population gefunden worden sind. Hierbei beschränkten wir uns auf den noch nicht beschriebenen Polymorphismus c.-20C>A in der 5'UTR und die beiden nicht-synonymen SNPs c.1381C>T und c.2341G>A (siehe Tabelle 3.2). Die beiden Polymorphismen c.2341G>A und c.-20C>A waren beide noch nicht in einer Datenbank beschrieben und könnten eine Auswirkung auf die Aminosäuresequenz haben. Der nichtsynonyme Polymorphismus c.1381C>T

wurde zwar schon beschrieben, tauchte aber in der ersten Population nur in einem EOPD-Patienten und Geschwisterkinds mit einem Alter unter 50 Jahren (AaS = 42 Jahre) auf.

**Tabelle 3: Polymorphismen im PLA2G6 Gen in der Patienten - Kontroll - Gruppe 2**

<sup>1</sup> Die Position auf der mRNA (NCBI: accession number NM_003560) <sup>2</sup> Die Position und Aminosäure auf Proteinebene (NCBI: accession number NP_003551) <sup>3</sup> Nummer in der dbSNP Datenbank des NCBI; <sup>4</sup> Alter bei Beginn der Symptome <sup>5</sup> Alter bei der Blutentnahme							
Mutation <sup>1</sup>	Exon	Resultat <sup>2</sup>	dbSNP <sup>3</sup>	Patienten	AaO <sup>4</sup>	Kontrollen	AaS <sup>5</sup>
c-20C>A	2	( 5'-UTR )	-	n = 2	42 / 49	n = 1	22
c1381C>T	10	p.R461W	rs76718524	-	-	-	-
c2339A>G	17	p.N780S	rs1171614044	n = 2	45 / 49	-	-
c2340C>T	17	p.N780N	-	n = 1	29	n = 3	22 - 60
c2341G>A	17	p.A781T	rs139093920	-	-	-	-

### 3.2.1 c.-20C>A Polymorphismus, Exon 2

Den unter 3.1.2 beschriebenen c.-20C>A Polymorphismus in der 5'UTR wurde in der zweiten Patienten-Gruppe bei zwei verschiedenen Patienten mit einem EOPD (14231, AaO = 42 Jahre und 17674, AaO = 49 Jahre) nachgewiesen. In der 2. Kontroll-Gruppe wurde der Polymorphismus bei einer Person gefunden (21927, AaS = 22 Jahre). Die Patienten und Kontrollen waren nicht untereinander verwandt.

### 3.2.2 c.1381C>T Polymorphismus, Exon 10

Der nicht-synonyme SNP c.1381C>T konnte im zweiten Durchgang weder in der Gruppe mit EOPD – Patienten noch in der Gruppe der Kontrollpersonen nachgewiesen werden.

### 3.2.3 c.2340C>T Polymorphismus, Exon 17

In der zweiten Patienten-Population konnten wir den synonymen SNP c.2340C>T bei einem zusätzlichen Patienten (15132, AaO = 48 Jahre) nachweisen. Auch in der zweiten Kontrollgruppe konnte der Polymorphismus nachgewiesen werden. Die gesunden Personen 20546 (AaS = 51 Jahre),

21923 (AaS = 22 Jahre) und 21962 (AaS = 60 Jahre) zeigten alle den SNP. Der betroffene Patient und die Kontrollen waren untereinander nicht verwandt.

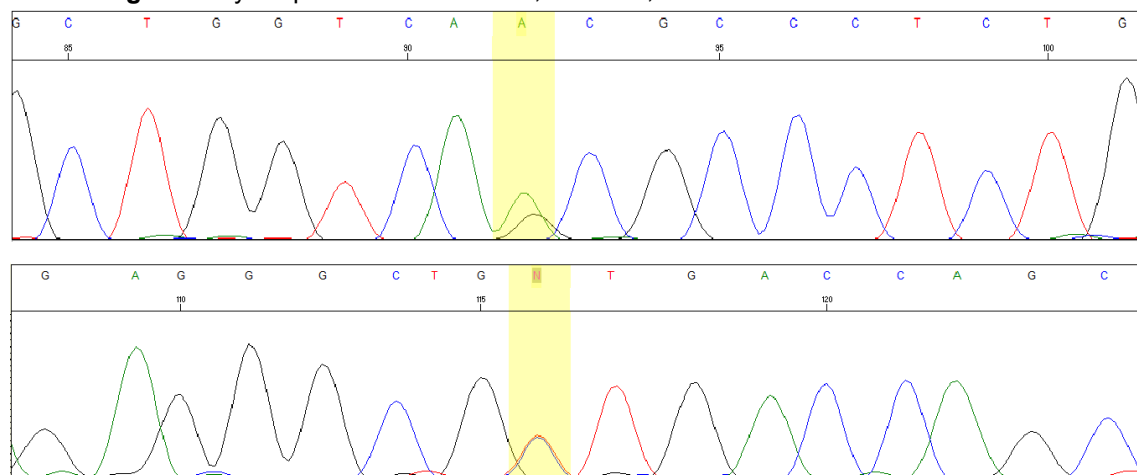
### 3.2.4 c.2341G>A Polymorphismus, Exon 17

Der nicht-synonyme SNP c.2341G>A konnte von uns weder in der zweiten EOPD – Gruppe noch in der Kontrollgruppe nachgewiesen werden.

### 3.2.5 c.2339A>G Polymorphismus, Exon 17

In der zweiten Patienten Population fanden wir, zu den schon in der Original-Population beschriebenen Mutationen an den Nukleotid-Positionen 2340 und 2341, einen nichtsynonymen SNP an der Position 2339. Dieser Austausch von Adenosin durch Guanin an der zweiten Stelle des Codons bewirkt den Wechsel von der Aminosäure Asparagin zu Serin an Position 780 der Aminosäuresequenz (p.N780S). Der SNP betrifft damit das gleiche Codon wie der oben beschriebenen c.2340 C>T Polymorphismus. Gefunden wurde dieser zusätzliche Polymorphismus bei zwei Parkinson – Patienten der zweiten EOPD-Population (11395, AaO = 45 Jahre und 18959, AaO = 49 Jahre). Der Polymorphismus wurde in keiner anderen Patienten- oder Kontroll-Gruppe nachgewiesen und ist mittlerweile unter der Nummer rs1171614044 gelistet.

**Abbildung 11:** Polymorphismus c.2339A>G; Exon 17; Patient 18959



Oben: Forward in 5'- 3' Richtung; Unten: Reverse in 5'- 3' Richtung  
A = Adenosin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin, N = Auffällig

## 4. Diskussion

In der vorliegenden Doktorarbeit wurde das PLA2G6 Gen bei Patienten mit einem EOPD auf vorkommende Polymorphismen untersucht. Die Ergebnisse wurden mit Gruppen aus gesunden Probanden verglichen. Seit dem Start unserer zugrundeliegenden Studie „The PLA2G6 gene in early-onset Parkinson's disease“ haben sich auch viele andere Arbeitsgruppen mit dem PLA2G6 Gen beschäftigt. Im Jahr 2009 charakterisierten Paisan-Ruiz et al. das PLA2G6 Gen als ein mögliches auslösendes Gen für Dystonie-Parkinsonismus (Paisan-Ruiz et al., 2009). Schneider et al. benannten im gleichen Jahr das PLA2G6 Gen erstmals als PARK14 (Schneider et al., 2009). Im Folgenden werden unsere verwendeten Arbeitsmethoden und Ergebnisse diskutiert und mit dem aktuellen Stand der Forschung in Bezug auf das PLA2G6 Gen und dem EOPD verglichen.

### 4.1 Patienten und Kontrollpersonen

Für die Untersuchung des PLA2G6 Gens bei Patienten mit einem EOPD auf Polymorphismen wurden Blutproben von insgesamt 525 Personen untersucht. Hiervon waren 268 Patienten mit einem EOPD diagnostiziert worden, bei 257 handelte es sich um gesunde Kontrollpersonen.

Unsere Patienten litten bei der Untersuchung an EOPD ( $AaO \leq 50$  Jahre) und erfüllten alle die Kriterien der UK Society Brain Bank. Bei den Kontrollpersonen wurde das Alter bei der Blutentnahme ( $AaS$ ) dokumentiert. Die gesunden Kontrollpersonen wurden mit einem halbstandardisierten Telefoninterview zu Symptomen einer Parkinson-Krankheit oder anderen Bewegungsstörungen befragt. Ausschlusskriterium war das Vorliegen eines dieser Symptome.

#### ***Größe des Patientenkollektivs***

Im Vergleich zu anderen Arbeiten, die sich mit Parkinson und dem PLA2G6 Gen beschäftigt haben, untersuchte diese Arbeit mit insgesamt 268 Personen mit einem EOPD ein vergleichsweise großes Patientenkollektiv. In anderen Arbeiten, die sich nicht nur mit betroffene Einzelpersonen oder betroffenen



Familien, sondern mit größeren Patientengruppen beschäftigt hatten, lagen die Fallzahlen zwischen 29 Patienten (Yoshino et al., 2010) und 250 Patienten (Gui et al., 2013).

### ***Das Telefoninterview***

Telefoninterviews können Hinweise auf Bewegungsstörungen erbringen, eine Diagnose ist ohne eine klinisch-neurologische Untersuchung jedoch nicht möglich. Eine komplette neurologische Untersuchung aller Kontrollen ist jedoch sehr aufwendig und vor allem in Studien mit großen Fallzahlen kaum zu gewährleisten. Zudem erhöht die klinische Untersuchung den Aufwand für die gesunden Personen, was eine Rekrutierung von Gruppen mit höheren Fallzahlen zusätzlich erschwert.

### ***Pairing in der ersten EOPD-Kontroll-Gruppe***

Unsere erste Patienten-Kontroll-Gruppe bestand aus „Paaren“ von je einem EOPD – Patienten und einem gesunden Geschwisterkind des betroffenen Patienten. Hier wurden alle 17 Exone des PLA2G6 Gens untersucht. Diese Patienten-Verwandten-Paare wurden für eine möglichst gute Vergleichbarkeit der gefundenen Polymorphismen gebildet. Mögliche familiäre, funktionell aber unbedeutende SNPs können so einfacher identifiziert werden. Aus diesem Grund wurden beim Auffinden von Polymorphismen in der ersten Patienten Gruppe zusätzlich die weiteren Geschwister des betroffenen Patienten oder der betroffenen gesunden Person untersucht.

### ***Age at onset und Age at sampling***

Das Alter der Patienten bei Beginn der Krankheit (AaO) ist ein von uns klar definiertes Einschlusskriterium. International gibt es keine einheitliche Definition des EOPD. So wird teilweise von einem AaO von bis zu 40 Jahren gesprochen (Schrag and Schott, 2006), in den letzten Jahren setzte sich aber zunehmend ein AaO von bis zu 50 Jahren durch (Fereshtehnejad et al., 2014, Ferguson et al., 2016). Für diese Arbeit wurde das AaO ebenfalls auf 50 Jahre und jünger festgelegt.

Betrachtet man die Altersstruktur bei dem Beginn der Erkrankung unserer Patienten, fällt auf, dass zwar alle Patienten nach unserer Definition des EOPD ein AaO von  $\leq 50$  Jahren haben, die Verteilung des AaO jedoch nicht einheitlich ist. So sind viel mehr Patienten mit einem späteren AaO vertreten als mit jüngerem AaO. Dies zeigt auch der Durchschnitt von 41,4 Jahren in der ersten und 42,5 Jahren in der zweiten EOPD-Gruppe. Dies spiegelt die normale Altersverteilung bei dem Parkinson-Syndrom wieder, steigt doch die Prävalenz mit ansteigendem Alter an. Betrachtet man aber die – überwiegend im Anschluss an diese Arbeit – in der internationalen Literatur beschriebenen Patienten mit Mutationen im PLA2G6 Gen, fällt auf, dass die Patienten bei Beginn der Erkrankung oft jünger waren. Zwar werden auch Patienten mit einem AaO von 59 bis zu 69 Jahren beschrieben (Gui et al., 2013, Tan et al., 2010), die meisten sind aber bei Beginn der Symptome jünger als 40 Jahre (Tian et al., 2012, Yoshino et al., 2010, Karkheiran et al., 2015). In der Arbeit von Karkheiran über die bis 2015 veröffentlichten Patienten mit Mutationen im PLA2G6 Gen wurden insgesamt 24 Patienten aus 17 Familien, die aus 10 verschiedenen Ländern stammen, verglichen. Die Patienten waren zwischen 4 und 37 Jahren alt, durchschnittlich lag das AaO bei 21,5 Jahren (Karkheiran et al., 2015). In diesem Altersbereich lagen in unserer Arbeit nur 24 (23,5%) der Patienten der ersten und 38 (22,9%) der Patienten der zweiten EOPD-Gruppe. Dabei waren unsere jüngsten Patienten nur 19 Jahre (Gruppe 1) beziehungsweise 18 Jahre (Gruppe 2) alt. Patienten unter 18 Jahre wurden nicht in unsere Studie eingeschlossen.

#### ***Alter der Kontrollgruppe***

Das Einschluss-Kriterium für die Kontrollpersonen war lediglich das Fehlen von Symptomen mit Hinweis auf ein Parkinson-Syndrom oder eine andere Bewegungsstörung. Zum Zeitpunkt der Blutentnahme wurde das Alter der Kontrollperson dokumentiert. Das AaS sagt jedoch nur etwas über die Freiheit von verdächtigen Symptomen zu und vor diesem Zeitpunkt aus. Liegt das AaS unter 51 Jahren, besteht die Möglichkeit, dass diese Kontrollperson bis zu einem Lebensalter von 50 Jahren noch Symptome eines EOPD entwickelt. Diese Möglichkeit sollte man vor allem bei den Kontrollen in Betracht ziehen, die ein AaS deutlich unter 51 Jahren und einen Polymorphismus aus einer

EOPD-Gruppe aufweisen. Dies betrifft sowohl Personen der ersten als auch der zweiten Kontrollgruppe. In der ersten waren insgesamt 8 Personen mit insgesamt 4 SNPs betroffen. In der zweiten Gruppe betraf es nur 2 Personen mit je einem SNP. Die Auflistung der Personen und der SNPs erfolgte im Abschnitt [4.3 Ergebnisse](#). Um diese Möglichkeit zu untersuchen, könnte man hypothetisch alle Patienten mit einem AaS von unter 51 Jahren per Telefoninterview erneut nach ihrem 50. Geburtstag befragen, ob es seit der ersten Befragung zum Auftreten von verdächtigen Symptomen oder einer Parkinson-Krankheit oder ähnlichen Symptomen gekommen ist. Zudem besteht die Möglichkeit, dass die besagten Kontrollpersonen noch im Alter ab 51 Jahren ein Parkinson-Syndrom entwickeln.

### ***Klinik der Patienten***

Die Schwere oder die genaue Ausprägung der Symptome der Patienten mit einem EOPD wurden in dieser Arbeit nicht berücksichtigt. Ziel war es einzig, einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten verschiedener Polymorphismen im PLA2G6 Gen und dem Auftreten eines EOPD herzustellen. Von den drei Patienten, die von den nicht-synonymen SNPs c.2341G>A und c.2339A>G betroffen waren, hatten zwei einen Äquivalenz-Typ (beide c.2339A>G) und der dritte einen akinetisch-rigiden Typ (c.2341G>A). Hier könnte man einen Zusammenhang zwischen Phänotyp und Genotyp annehmen, jedoch zeigten die beiden Patienten mit dem Äquivalenztyp einen unterschiedlichen Verlauf beziehungsweise unterschiedliche Begleitsymptome. Um bei diesen Mutationen einen Zusammenhang zwischen Genotyp und Phänotyp zu untersuchen, sollte man zudem den gesamten Krankheitsverlauf des Patienten hinzuziehen. Zudem sollten eine genetische und klinische Untersuchung der gesamten Patientenfamilie durchgeführt werden.

Viele Studien haben sich mit diesem Thema auseinander gesetzt und gezeigt, dass es bei Patienten mit Mutationen im PLA2G6 Gen eine Vielzahl von verschiedenen Phänotypen gibt (Karkheiran et al., 2015). So hatten die ersten Patienten, die von Paisan-Ruiz et al. beschrieben wurden, Dystonie und Bradykinese als hauptsächliche Symptome, zudem eine starke kognitive Beeinträchtigung mit Persönlichkeitsstörung, asymmetrische

Pyramidenbahnzeichen und Spastik (Paisan-Ruiz et al., 2009). In einem kürzlich veröffentlichten Fall einer türkischen Patientin mit der gleichen Mutation (p.R747W) imponierte eine frühzeitige schwere Bradykinese, Hypomimie und eine frühe Unfähigkeit, alleine zu laufen oder zu stehen. Persönlichkeitsstörungen oder Pyramidenbahnzeichen traten bei der Patientin jedoch nicht auf (Giri et al., 2016). In einer Studie über einen chinesischen Patienten mit einem autosomal-recessiven EOPD zeigte sich ein tremordominanter Typ, ohne pyramidale oder cerebellare Symptome (Shi et al., 2011). Hinzu kommen noch die anderen neurodegenerativen Erkrankungen, die mit Mutationen im PLA2G6 Gen assoziiert sind (PLAN). Wie schon in der Einleitung beschrieben zählen hierzu neben EOPD auch INAD und NBIA. Auch hier sind Phänotyp und Genotyp nicht immer in Einklang zu bringen. Teilweise kommt es auch intrafamiliär zu unterschiedlichen Krankheitsbildern. Im Jahr 2015 beschrieben Kim et al. eine Familie aus Korea, in der bei zwei Brüdern Mutationen im PLA2G6 Gen nachgewiesen worden waren. Der eine Bruder zeigte einen dystoniebetonten Parkinsonismus und der andere eine kindliche atypische neuroaxonale Dystrophie (Kim et al., 2015).

Aktuell gibt es keinen klaren Zusammenhang zwischen dem Genotyp und dem Phänotyp bei Mutationen im PLA2G6 Gen. Eine Untersuchung der genauen Symptome von Patienten mit einem aufgetretenen Polymorphismus und eine Gegenüberstellung mit EOPD-Patienten ohne Mutation sollte auch weiterhin Gegenstand zukünftiger Studien sein.

## **4.2 Material und Methoden**

Wie unter 2 beschrieben, wurden bei der Durchführung der Studie Standardverfahren zur Materialgewinnung, Materialaufbereitung und Materialbearbeitung verwendet. Die Methoden wurden bereits in vielen zurückliegenden Arbeiten zur Untersuchung des PLA2G6 Gens bei neurodegenerativen Erkrankungen verwendet. Alle Arbeitsschritte wurden exakt nach den Vorgaben der jeweiligen Hersteller durchgeführt.

Die initiale Auswertung der erhaltenden Nukleotidsequenzen durch das BLAST - Programm ergab einen hohen Anteil an Sequenzen mit angeblichen Mutationen. Durch manuelles Kontrollieren der betroffenen Sequenzen bzw. der graphischen Ausdrücke (siehe z.B. Abbildung 3) zeigte sich, dass ein hoher Anteil an Ablesefehlern durch das BLAST - Programm besteht. Zum Beispiel interpretierte der Sequenzer in *forward*-Richtung in Abbildung 3 den kleinen Ausschlag an Position 238 als mögliche Insertion. Dieser Anteil an falsch-positiven Ergebnissen konnte durch die manuelle Kontrolle der Sequenzerausdrücke und bei zu vielen Ablesefehlern durch wiederholtes Aufreinigen der Produkte und erneutes Sequenzieren aussortiert werden. Daraufhin erfolgte eine manuelle Auswertung der Sequenzen der durch Polymorphismen betroffenen Exone. Alle in dieser Arbeit gefundenen Polymorphismen wurden jedoch beim ersten Sequenzieren eindeutig erkannt. Falsch-negative Ergebnisse zeigten sich nicht. Eine komplette manuelle Auswertung ist bei großen Fallzahlen und vor allem bei größeren Genen mit vielen Exons jedoch nicht praktikabel. Das Risiko von nicht erkannten Polymorphismen liegt also in der durch den Hersteller angegebenen Höhe.

In dieser Arbeit wurden nur die 17 Exons des PLA2G6 Gens betrachtet. Die Introns wurden nicht sequenziert. Mit Ausnahme der 5'-UTR und der 3'-UTR wurden damit nur die codierenden Bereiche des Gens analysiert. Seit langem ist bekannt, dass einzelne Gene durch alternatives Splicing zu unterschiedlichen Proteinsequenzen führen kann (Barash et al., 2010). In einer Studien über das PLA2G6 Gen wurden nach Angaben der Autoren auch Exon-Intron-Grenzbereiche untersucht, laut den Angaben wurden die Primer jedoch nach der Arbeit von Morgan et al. entworfen, nach deren Arbeit auch wir unserer Primer erstellt haben (Shi et al., 2011). Genauer geht die Arbeit nicht mehr auf die Introns ein, gegebenenfalls ist auch die 5'-UTR oder 3'-UTR gemeint. Aussagen über die nicht codierenden Bereiche, die gegebenenfalls bei alternativem Splicing oder Genregulationsmechanismen in die Funktion des Proteins eingreifen, können wir mit unserer Arbeit nicht machen.

Die Auswertung der Exone bzw. Polymorphismen in den einzelnen Gruppen wurde nach einer klaren Abstufung durchgeführt. In der ersten EOPD-Gruppe

wurden alle Exone des PLA2G6 Gens untersucht. Die erste Kontrollgruppe wurde nur noch auf die betroffenen Exone 1, 2, 5, 7, 10 und 17 untersucht. Es ging hierbei lediglich um den direkten Vergleich, ob die gefundenen SNPs auch in den Kontrollen gefunden werden konnten oder nur in den EOPD – Patienten vorlagen. Dadurch, dass wir die anderen Exone nicht in der ersten Kontrollgruppe untersucht haben, kann diese Arbeit jedoch keine Aussage über mögliche Unterschiede der allgemeinen Häufigkeit von SNPs im PLA2G6 Gen von EOPD-Patienten und gesunden Personen machen.

In der zweiten EOPD- und Kontroll-Gruppe wurden die Exone der ausgewählten SNPs c.-20C>A, c.1381C>T, c.2339A>G, c.2340C>T und c.2341G>A untersucht. Diese Auswahl wurde nach Erhalt der Ergebnisse aus der ersten Patienten-Kontroll-Gruppe vorgenommen. Ausgewählt wurden Mutationen, die eine Veränderung in der Aminosäuresequenz bewirkten, so genannte Missense-Mutationen. Zudem durften sie nicht in der Kontroll-Gruppe gefunden worden sein. Eine Ausnahme waren die Mutation c.1381C>T, bei der ein Geschwisterkind dieselbe Mutation aufwies, jedoch mit dem AaS von 42 Jahren unter dem möglichen AaO von 50 Jahren lag und die Mutation c.-20C>A aus der 5'UTR, die bis zu dem Zeitpunkt in den untersuchten Datenbanken noch nicht genannt war.

Eine weitere Beschränkung für Aussagen von Studien wie dieser ist die Unmöglichkeit, andere krankheitsverursachende Mutationen auszuschließen, die ebenfalls zu der untersuchten Erkrankung führen. Beim EOPD wären das zum Beispiel Mutationen im PARKIN, PINK1, DJ-1, ATP13A2 und FBX07 Gen. Das Kollektiv der Patienten – Kontroll – Gruppe 1 dieser Arbeit wurde bereits in der Arbeit von Möller et al. auf den p.H1069Q Polymorphismus, den häufigsten Polymorphismus bei Morbus Wilson untersucht, konnte jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Populationen feststellen (Möller et al., 2006). Zudem wurden bei einer Subpopulation unserer Gruppe Mutationen im DJ1, UCHL1 und NR4A2 Gen ausgeschlossen (Rissling, 2004). Die meisten bekannten Mutationen, die bei EOPD-Patienten gefunden worden sind, wurden bei unseren Patienten bisher nicht untersucht. Zwei Studien, bei denen das PLA2G6 Gen untersucht und o.g. Mutationen ausgeschlossen worden sind,

wurden von Shi et al. und Bohlega et al. erstellt. Jedoch wurden in beiden Arbeiten nur wenige Patienten aus zwei beziehungsweise 12 Familien untersucht (Shi et al., 2011, Bohlega et al., 2016). Dieses Studiendesign, bei einer größeren Gruppe von Beginn an bei allen zu untersuchenden Patienten durchzuführen, ist wenig praktikabel. Jedoch könnten in folgenden Studien die Patienten mit den gefundenen Mutationen auf die bekannten PARK-Gene untersucht werden.

### **4.3 Ergebnisse**

Wir haben in dieser Arbeit insgesamt 11 SNPs im PLA2G6 Gen bei Patienten mit EOPD gefunden. Zehn davon wurden in der ersten EOPD-Gruppe aus 102 Patienten gefunden (siehe Tabelle 2). Der elfte SNP (c.2339A>G) trat nur in der zweiten EOPD – Gruppe mit 166 Patienten auf (siehe Tabelle 4).

Bei allen gefundenen Mutationen handelte es sich um heterozygote Mutationen. Homozygote Mutationen wurden nicht gefunden. Die Heterozygotie bedeutet, dass bei jeder Mutation ein Allel das normale Nukleotid des Wildtyps und auf dem anderen Allel das mutierte, veränderte Nukleotid trägt. Ob es sich bei den einzelnen Patienten um eine spontane Mutation oder einen vererbten Polymorphismus handelt, ist mit dieser Arbeit nicht abschließend zu klären. Auf familiäre Polymorphismen könnte einzig die erste EOPD-Gruppe mit den zugehörigen, gesunden Geschwistern hinweisen. Bei den beiden Mutationen c.1381C>T und c.-20C>A, wo sowohl ein EOPD-Patient als auch einer der jeweiligen Geschwister betroffen war, ist eine familiäre Mutation wahrscheinlich, kann jedoch ohne die Untersuchung der Eltern nicht gesichert werden. Dies gilt auch für alle Mutationen, die zwar bei einem EOPD-Patienten gefunden worden sind, jedoch nicht bei seinem Geschwisterkind. Auch auf den möglichen Erbgang oder die Penetranz der Mutationen können wir aus diesen Gründen keine klaren Rückschlüsse ziehen. Zu der Penetranz der Mutationen, ob das mutierte Allel dominant ist und somit zu einem anderen Phänotyp im Vergleich zu dem Wildtyp wird, oder die betroffenen Patienten bzw. Kontrollen mit den heterozygoten Mutationen Konduktoren sind, können wir mit unserem

Studiendesign ebenfalls nicht klären. Hierfür müssten die betroffenen Familien komplett nach den Mutationen gescreent und klinisch untersucht werden, wie es zum Beispiel in den Arbeiten von Shi et al. oder Bohlega et al. durchgeführt worden war (Shi et al., 2011, Bohlega et al., 2016).

### ***EOPD-Kontroll-Gruppe 1***

Von den gefundenen 10 Polymorphismen wurden sieben sowohl in der ersten Patientengruppe mit einem EOPD, als auch in der Kontrollgruppe mit den gesunden Geschwistern nachgewiesen. Dies betraf die SNPs c.-130C>T (Patienten: n = 2; Kontrollen: n = 3) und c.-20C>A (Patienten: n = 1; Kontrollen: n = 1) in der 5'UTR, c.87G>A auf Exon 2 (Patienten: n= 5, Kontrollen: n=6), c.966C>T (Patienten: n= 1; Kontrollen: n= 1), c.1027G>A auf Exon 7 (Patienten: n = 2; Kontrollen n = 8), c.1381C>T auf Exon 10 (Patienten: n = 1; Kontrollen: n = 1) und c.2340C>T auf Exon 17 (Patienten: n = 1; Kontrollen: n = 2). Da diese Polymorphismen in beiden Gruppen gefunden wurden, haben sie für unsere Studie wahrscheinlich keine Relevanz. Die beiden zuletzt genannten Mutationen c.1381C>T in Exon 10 und c.2340C>T in Exon 17 sind mglw. von Interesse, da zwar beide Mutationen auch bei gesunden Personen nachgewiesen wurden, jedoch alle drei Personen bei der Probenentnahme ein Alter unter 51 Jahren aufwiesen (AaS = 42, 38, 49 Jahre). Je eine Kontrollperson war mit den betroffenen Patienten verwandt. Der SNP c.2340C>T ist ein synonymer Polymorphismus und bewirkt keine Änderung in der Aminosäuresequenz. Eine phänotypische Relevanz ist also unwahrscheinlich. Der SNP c.1381C>T ist eine Missense-Mutation und führt zu der Veränderung p.R461W in der Aminosäuresequenz.

Von den 3 Polymorphismen, die nur in der ersten EOPD-Gruppe nachgewiesen wurden, sind 2 SNPs ohne Relevanz für die Aminosäure-Sequenz, also synonyme Polymorphismen (c.756C>T auf Exon 5, c.957G>A auf Exon 7). Der SNP c.957G>A ist bereits unter der Nummer rs11570679 in der Datenbank des NCBI mit einer Heterozygotenfrequenz von 0,13 beschrieben. Eine klinische Relevanz ist nicht bekannt. Auch hier halten wir eine Bedeutung für die Entwicklung des EOPD eher für unwahrscheinlich.



Der interessanteste Polymorphismus in dieser EOPD-Gruppe war der nicht-synonyme SNP c.2341G>A auf Exon 17. Er wurde in einem Patienten mit EOPD gefunden, jedoch in keiner gesunden Kontrollperson. Die Mutation in der Nukleotidsequenz führt zu einem Austausch der Aminosäure Alanin an Position 781 zu Threonin (p.A781T). Der Patient mit der Mutation litt unter einem sporadisch aufgetretenen EOPD. Die Symptome starteten im Alter von 30 Jahren (AaO = 30 Jahre) und zeigten klinisch einen akinetisch – rigiden Parkinsonstyp. In den folgenden 16 Krankheitsjahren traten deutliche Fluktuationen in den motorischen Symptomen des Patienten auf.

### ***EOPD-Kontroll-Gruppe 2***

In dieser zweiten Gruppe von Patienten beziehungsweise gesunden Kontrollpersonen konnten wir den noch nicht beschriebenen SNP c.-20C>A in zwei Patienten und einer gesunden, mit keinem der betroffenen Patienten verwandten Kontrollperson nachweisen. Der synonyme Polymorphismus c.2340C>T, von dem in der ersten Gruppe zwei Geschwister betroffen waren (siehe oben), wurde in der zweiten Gruppe in einem Patienten und drei gesunden Kontrollpersonen nachgewiesen. Die Missense-Mutationen c.1381C>T und c.2341G>A wurden weder in der zweiten EOPD- noch in der zweiten Kontrollgruppe gefunden. In dieser zweiten EOPD-Gruppe wurde jedoch der nicht synonyme Polymorphismus c.2339A>G in zwei Patienten gefunden. In der Kontrollgruppe wurde der SNP nicht nachgewiesen. Der Polymorphismus führt zu einem Austausch von Asparagin zu Serin an der Position 780 der Aminosäuresequenz (p.N780S). Bei beiden Patienten trat das EOPD sporadisch auf. Der eine Patient mit dieser Mutation zeigte die ersten Symptome seiner Erkrankung im Alter von 45 Jahren. Im weiteren Krankheitsverlauf zeigte er einen Äquivalenztyp und litt nach acht Jahren unter dopaminergem Psychotikum und Demenz. Bei dem zweiten Patienten begannen die Parkinsonsymptome im Alter von 49 Jahren. Auch er zeigte klinisch einen Äquivalenztyp. Bis zu einer Kontrolluntersuchung nach einem Jahr zeigte er weder motorische noch psychische Komplikationen. Die drei Patienten mit den Polymorphismen p.N780S und p.A781T waren nicht miteinander verwandt.

Wir haben somit in dieser Arbeit zwei neue heterozygote Missense-Mutationen in drei von 268 Patienten (1,12%) mit einem EOPD nachgewiesen, die in keiner der 257 gesunden Kontrollpersonen nachgewiesen worden sind. Es besteht die Möglichkeit, dass diese Mutationen für die betroffenen Patienten eine Ursache in der Entwicklung ihrer Erkrankung sind. Unsere Studienergebnisse ergaben aber keinen Hinweis eines direkten Zusammenhangs zwischen Mutationen im PLA2G6 Gen und der generellen Entwicklung eines EOPD bei diesen Personen.

#### **4.4 Vergleich mit aktuellen Studien**

Seit diese Studie im November 2011 unter dem Titel „The PLA2G6 gene in early-onset Parkinson's disease“ (Kauther et al., 2011) erschienen ist, haben sich viele Arbeitsgruppen mit dem gleichen Thema auseinander gesetzt. Diese Studien differieren jedoch sowohl hinsichtlich ihres Aufbaus als auch in den Ergebnissen, die sie erzielt haben. Insgesamt kristallisieren sich zwei Arten von Arbeiten heraus.

Viele Arbeiten sind ähnlich aufgebaut wie die unsere. Es wird eine größere Gruppe von Parkinson-Patienten auf Mutationen im PLA2G6 Gen untersucht. Unterscheidungen zwischen familiärem und sporadischem Auftreten werden bei der Gruppenauswahl meist nicht getroffen, zudem differieren das AaO und die Anzahl der Patienten. In der Studie von Tan et al. wurde in einer Gruppe von 96 Patienten mit EOPD, Dystonie oder positiver Familienanamnese eine heterozygote Mutation (c.2417C>G) auf Exon 17 bei einem Patienten mit Parkinson und einem AaO von 69 Jahren beschrieben (Tan et al., 2010). In einer anderen Arbeit wurde eine heterozygote Missense-Mutation (c.2036G>T) auf Exon 15 bei einem Patienten mit AaO von 30 Jahren in einer Gruppe von 72 Patienten mit EOPD (AaO <40 Jahren) gefunden, nicht jedoch in 500 gesunden Kontrollpersonen. Zudem konnten vier bereits beschriebene synonyme SNPs nachgewiesen werden (Tian et al., 2012). In einer Gruppe von 29 ausgewählten Patienten mit EOPD und einem AaO unter 30 Jahren wurden zwei compound - heterozygote Mutationen in 3 Patienten nachgewiesen. Alle drei Patienten hatten einen L-Dopa responsiven Parkinsonismus, eine Demenz und litten unter

relativ schneller Krankheitsprogression. In einem der Patienten konnten Eisenablagerungen in der Substantia nigra und im Striatum nachgewiesen werden (Yoshino et al., 2010). Die Gruppe um Tomiyama et al. konnte 2 heterozygote Missense – Mutationen (c.901C>T und c.991G>A) in zwei Patienten von 116 Japanern mit sporadisch aufgetretenen Parkinson und einem Alter von 12 bis 92 Jahren nachweisen, welche in der Kontrollgruppe mit 310 Personen nicht zu finden waren (Tomiyama et al., 2011). Im Jahr 2013 veröffentlichten Gui et al. ihre Studie über Mutationen im PLA2G6 Gen in einer chinesischen Population von 250 Parkinsonpatienten. Das Age at onset wurde mit 45 – 65 Jahren angegeben. Insgesamt wurden 4 heterozygote Mutationen bei je einem Patienten nachgewiesen. Das Age at onset dieser Patienten lag jedoch bei allen über 58 Jahre (Gui et al., 2013). Keine dieser Arbeiten wertete die Ergebnisse als Hinweis auf eine eindeutige Verbindung zwischen dem PLA2G6 Gen und dem EOPD beziehungsweise dem Parkinson-Syndrom.

In anderen Arbeiten wurden Familien untersucht, in denen eine Häufung von neurodegenerativen Erkrankungen ohne klare Einordnung oder besondere Symptome auftraten. Die Arbeitsgruppe um Paisan-Ruiz et al. untersuchte 2009 als Erste zwei Familien mit rezessivem Parkinsonismus und Dystonie, bei denen die bisher bekannten Gene nicht mutiert waren. Hier konnten pro Familie je eine homozygote Mutation (c.2222G>A und c.2239C>T) im PLA2G6 Gen nachgewiesen werden (Paisan-Ruiz et al., 2009). Nach diesem Muster wurden seitdem viele Familien mit Mutationen im PLA2G6 Gen identifiziert. Fast alle Familien sind von rezessiv vererbten, homozygoten Mutationen betroffen. Der c.2222G>A Polymorphismus ist einer der am meisten nachgewiesenen SNPs bei Patienten mit Mutationen im PLA2G6 Gen und Early-onset Parkinsonismus. Er wurde in mindestens 5 Familien nachgewiesen, zwei stammten aus Indien (Paisan-Ruiz et al., 2009, Virmani et al., 2014), zwei aus Saudi-Arabien (Bohlega et al., 2016) und eine aus Pakistan (Karkheiran et al., 2015). In diesen Familien konnte man jedoch beobachten, dass nicht alle Patienten mit den Mutationen auch klinisch betroffen sind. So werden von Bohlega et al. insgesamt 2 Familien vorgestellt, die von der Mutation c.2222G>A betroffen sind. Jedoch haben von den 5 Personen mit der homozygoten Mutation nur 3 Patienten (AaO 22, 25 und 26 Jahre) klinische Symptome. Die zwei anderen

Personen zeigten bei der Untersuchung keinerlei Symptome (Alter bei der Untersuchung 18 und 28 Jahre) (Bohlega et al., 2016).

Auch die klinische Ausprägung der Symptome ist, wie in dieser Studie unter 4.1 beschrieben, bei den Patienten mit PLA2G6 Mutationen und einem EOPD sehr variabel. Alle Patienten leiden unter Bradykinese und Rigidität, jedoch in unterschiedlicher Ausprägung. Depression und Psychosen als Begleitsymptome kommen gehäuft vor und gehen den Kardinalsymptomen teils auch voraus (Karkheiran et al., 2015). Xie et al. hat die Symptome von insgesamt 4 Patienten mit dem SNP 991G>T verglichen und spricht hier von einer Korrelation zwischen dem Phänotyp und dem Genotyp. Die betroffenen Patienten hatten alle einen Parkinsonismus ohne jegliche Dystonie und stammten aus verschiedenen Familien (Xie et al., 2015). Um einen klaren Zusammenhang zwischen Phänotyp und Genotyp nachzuweisen, werden weitere Untersuchungen, insbesondere Langzeituntersuchungen benötigt.

#### **4.5 Die Rolle der Phospholipase A2 in der Neurodegeneration**

Die calciumunabhängige Phospholipase A2 Gruppe VI (iPLA2 VI) ist ein in der Membranhomöostase von Neuronen essentielles Protein. Durch den Ausbau von alten oder defekten Fettsäuren aus Phospholipidmembranen ist sie neben der Acetyl-CoA-Transferase, die neue Fettsäuren wieder einbaut, eine der wichtigsten Proteine im Membranremodeling (Shindou et al., 2013). Gerade das Remodeling von Zellmembranen von Axonen und Synapsen im zentralen Nervensystem ist essentiell für die langanhaltende Unversehrtheit der Neuronen und demnach für die Gehirnfunktion (Glynn, 2013). Im Jahr 2012 konnte die Arbeitsgruppe um Paisan-Ruiz et al. in Gehirnen von Patienten mit Mutationen im PLA2G6 Gen  $\alpha$ -Synuclein positive Lewy-Bodys nachweisen (Paisan-Ruiz et al., 2012). Diese stehen in einem engen Zusammenhang mit einer Vielzahl von neurodegenerativen Prozessen.

In einer Studie mit einem PLA2G6-Knockout-Gen in Fliegen konnte die Arbeitsgruppe um Kinghorn et al. zeigen, dass eine abnormale Funktion des PLA2G6 Gens zu erhöhten Werten von ROS sowohl im Cytoplasma als auch in

Mitochondrien und zu mitochondrialer Dysfunktion beziehungsweise mitochondrialen Membrandefekten führt (Kinghorn et al., 2015).

Mehrere PLA2G6-Knockout-Maus Studien konnten in den letzten Jahren die Pathophysiologie von neurodegenerativen Erkrankungen, die mit dem PLA2G6 Gen assoziiert sind (PLAN), weiter aufzeigen. Die Arbeitsgruppe unter Beck et al. zeigte, dass es zur Schädigung von inneren Mitochondrienmembranen und präsynaptischen Membranen kommt. Dies führt zu verstärktem Freisetzen von ROS wie Cytochrom C aus den Mitochondrien beziehungsweise in die Präsynapse (Beck et al., 2011). Die gleiche Studie konnte zeigen, dass diese abnormen Mitochondrien in sogenannten Granula langsam über die Axone nach distal abtransportiert werden. Durch den oxidativen Stress im Bereich der Axone bzw. der Präsynapse degenerieren die Bereiche zu sogenannten Sphäroiden. In einer aktuellen Studie konnte eine weitere Arbeitsgruppe um Beck zeigen, dass die Neurodegeneration vor allem die distalen Bereiche der dopaminergen Neurone betrifft (Beck et al., 2016).

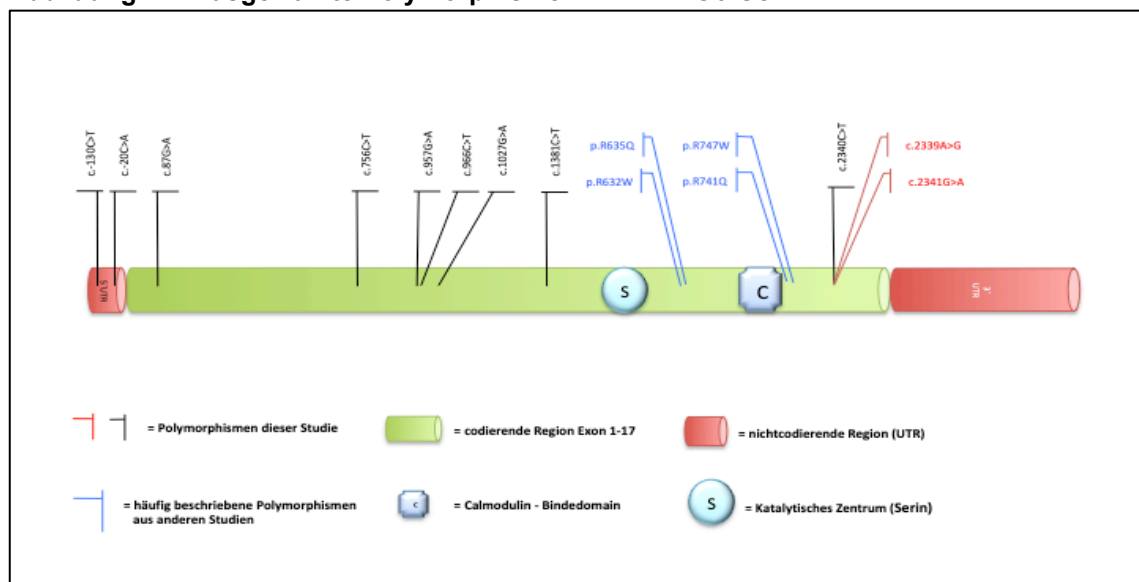
Ein weiterer Pathomechanismus, der mit verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen in Verbindung gebracht wird, ist die Autophagie. Sie ist eng mit anderen Mechanismen wie oxidativem Stress und mitochondrialer Dysfunktion verbunden, und es konnte auch gezeigt werden, dass verschiedene PARK-Gene ebenfalls zu Dysfunktionen in Autophagieprozessen führen (Lynch-Day et al., 2012). In einer neuen Studie aus dem Jahr 2016 konnten Zhou et al. an einem neuen PLA2G6-Knockout-Maus-Model demonstrieren, dass Mutationen im PLA2G6 Gen ähnlich wie die, die bereits beschrieben worden sind (p.R747W), über eine gestörte Calciumhomöostase zu einer beeinträchtigten Autophagiefunktion der Neurone führen können (Zhou et al., 2016).

### ***Aufbau der iPLA2 VI***

Die von uns nachgewiesenen bedeutenden Polymorphismen c.2339A>G und c.2341G>A liegen in dem Exon 17 auf benachbarten Codons und führen zu einer Änderung der Aminosäuresequenz von Asparagin zu Serin beziehungsweise von Alanin zu Threonin. Das Exon 17 ist das letzte der Exone des PLA2G6 Gens. Betrachtet man den Aufbau der iPLA2 VI fällt auf, dass viele Funktionszentren auf der c-terminalen Hälfte des Proteins angelegt sind (siehe Abbildung 12, rote Pfeile). So wird das catalytische Zentrum mit dem

Serin an Position 519 der Proteinsequenz angegeben und auch der Bereich, an dem Calmodulin an die Phospholipase bindet, befindet sich nahe am Carboxy-Ende des Proteins (Balsinde and Balboa, 2005, Gui et al., 2013). Calmodulin hat eine wichtige Position in der Funktion der iPLA2 VI. In der Gegenwart von Calcium bindet Calmodulin fest an die iPLA2, was eine Inhibition der enzymatischen Aktivität auslöst. Ohne Calcium löst sich Calmodulin, und die hemmende Wirkung wird aufgehoben (Jenkins et al., 2001). Mutationen in diesen Bereichen können durch Veränderungen in den katalytischen Zentren Störungen in der Funktion des Proteins verursachen. Auch viele andere homozygote Mutationen sind im hinteren Bereich des Gens beschrieben. So sind die beiden häufig beschriebenen Mutationen p.R741Q und p.R747W auf dem Exon 16 und die Mutationen p.R632W und p.R635Q auf Exon 14 gelegen (siehe Abbildung 12, blaue Pfeile). Die weiteren von uns nachgewiesenen Mutationen verteilen sich über sonstige Exone des Gens und die 5'UTR (Abbildung 12, schwarze Pfeile). Auch die in anderen Arbeiten zitierten Mutationen verteilen sich fast über die gesamte Gensequenz (Exone 2, 7, 11, 12) (Karkheiran et al., 2015).

**Abbildung 12: Ausgewählte Polymorphismen im PLA2G6 Gen**



### **Aktivität der iPLA2 VI**

Die Arbeitsgruppe um Engel et al. untersuchte die Aktivität der iPLA2 VI mit Mutationen, die in INAD- und EOPD-Patienten nachgewiesen worden waren.

Es zeigte sich, dass die Aktivität der iPLA2 VI mit INAD-Mutationen auf 20% abgefallen war, die EOPD-Mutationen (p.R632W, p.R741Q, und p.R747W) die Aktivität der Phospholipase jedoch nicht beeinträchtigten (Engel et al., 2010).

Eine ähnliche Studie wurde durch Shi et al. durchgeführt. Hier zeigte sich bei einem Patienten mit einem EOPD und einem AaO von 37 Jahren die homozygote Mutation p.D331Y. In einer mit p.D331Y mutierten PLA2 VI wurde dabei eine reduzierte Enzymaktivität von nur noch 30% gemessen (Shi et al., 2011).

#### **4.6. Das PLA2G6 Gen als Suszeptibilitätsgen**

Kürzlich wurde durch die Arbeitsgruppe von Sumi – Akamaru et al. die These aufgestellt, dass der Abtransport der degenerierten Mitochondrien über die Axone ein Mechanismus der Zellen zum Schutz gegenüber der durch den oxidativen Stress ausgelösten Zellschädigung ist. Hierdurch könnte die Ausprägung der Degeneration und die Effektivität des Abtransportes geschädigter Mitochondrien zu unterschiedlich stark ausgeprägter Neurodegeneration führen. Dies könnte die unterschiedliche klinische Ausprägung zwischen INAD-, NBIA- und EOPD-Patienten mit Mutationen im PLA2G6 Gen erklären (Sumi-Akamaru et al., 2015). Auch Zhou et al. sprechen sich in Ihrer Studie für eine komplexe, multifaktorielle Ursache der neurodegenerativen Prozesse bei Parkinson aus. Ein defekter Calciumsignalweg durch Mutationen im PLA2G6 Gen könnte den pathologischen Prozesse in Gang setzen oder in Verbindung mit anderen Pathomechanismen verstärken (Zhou et al., 2016).

Es ist davon auszugehen, dass EOPD-Patienten zusätzliche Faktoren – seien es neuroprotektive oder neurodegenerative – zu Mutationen im PLA2G6 Gen aufweisen, welche die Neurodegeneration beschleunigen oder verlangsamen. Dies können sowohl exogene Faktoren als auch genetische Ursachen, wie zum Beispiel Mutationen in anderen PARK-Genen sein. Um solche möglichen Zusammenhänge zu klären, sollten zukünftige Arbeiten mit großen Kohorten von EOPD- bzw. PLAN-Patienten durchgeführt werden.

## 4.7 Fazit

Diese Studie und die aktuelle Forschung ergeben kein eindeutiges Bild hinsichtlich eines Zusammenhanges von Mutationen des PLA2G6 Gens und dem EOPD. Auch wenn die exakten Mechanismen in der Pathogenese vom Parkinson-Syndrom weiterhin unbekannt sind, zeigt sich weiterhin das sowohl der oxidative Stress, als auch ein erhöhter Eisengehalt im Gehirn von Parkinson-Patienten zwei der Hauptkomponenten sind. Die calcium-unabhängige Phospholipase A2, Gruppe VI (iPLA2 VI) spielt in diesen Vorgängen eine entscheidende Rolle. Nachgewiesen wurde die schädigende Wirkung einer defekten Phospholipase A2 durch ein mutiertes PLA2G6 Gen mit erhöhten ROS-Leveln, mitochondrialer Dysfunktion, neuroaxonomer Schädigung und Dysfunktion in Autophagieprozessen und frühzeitigem Verlust von dopaminergen Neuronen der Substantia nigra (Beck et al., 2011, Kinghorn et al., 2015, Zhou et al., 2016). Diese Pathomechanismen konnten sowohl bei Patienten mit EOPD als auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen nachgewiesen werden. Betrachtet man die EOPD - Patienten mit nachgewiesenen Mutationen im PLA2G6 Gen näher, so findet man, dass sie sowohl unter einander als auch im Vergleich mit den anderen verwandten neurodegenerativen Erkrankungen (PLAN) wie INAD und NBIA eine ausgesprochene heterogene Ausprägung der Phänotypen zeigen (Karkheiran et al., 2015). Zudem hatten die meisten Patienten mit nachgewiesenen Mutationen im PLA2G6 Gen ein sehr frühes AaO. Viele Patienten stammen aus einzelnen Familien mit Häufung von neurodegenerativen Erkrankungen. In den Studien mit großen Gruppen von untersuchten EOPD- oder PD-Patienten hatten jedoch die meisten betroffenen Patienten eine sporadisch auftretende Erkrankung.

Die beiden in dieser Studie gefundenen heterozygoten Missense-Mutationen c.2339A>G (n=2) und c.2341G>A (N=1), nachgewiesen in 3 von 268 EOPD Patienten (1,12%) mit einem AaO von 30, 45 und 49 Jahren, die in keiner der 257 gesunden Kontrollpersonen gefunden worden waren, konnten wir der mittlerweile langen Liste an gefundenen Mutationen im PLA2G6 Gen in EOPD-Patienten hinzufügen. Eine besondere oder sogar monogenetische Bedeutung



des PLA2G6 Gens beim EOPD konnten wir jedoch nicht nachweisen. In Zusammenschau unserer Ergebnisse und Auswertung der Literatur des aktuellen Forschungsfortschritt sehen wir das PLA2G6 Gen, im Sinne eines Suszeptibilitätsgens, als einen zusätzlichen Faktor in der Ätiologie des EOPD an. Auch wenn dies bei EOPD nur für einen kleinen Teil von Patienten zu gelten scheint, ist von einer relevanten Rolle des PLA2G6 Gens in der Pathologie von neurodegenerativen Erkrankungen allgemein auszugehen. Wir halten deshalb weitere Untersuchungen des PLA2G6 Gens bei EOPD-Patienten und anderen neurodegenerativen Erkrankungen in weiteren Arbeiten für notwendig.

## 5. Zusammenfassung

### 5.1 Deutsch

#### **Kauther, K.M.: „Das PLA2G6 Gen bei Parkinson Patienten mit frühem Krankheitsbeginn“**

Die Parkinson-Krankheit wurde vor fast 200 Jahren von James Parkinson erstmals als *shaking palsy* beschrieben. Sie beginnt meistens spät mit einem Altersgipfel um das 60. Lebensjahr, aber viele Patienten zeigen die Symptome auch in deutlich jüngeren Jahren. Die Patienten mit einem Beginn der Erkrankung unter 50 Jahren werden unter dem Begriff EOPD (engl. *early onset – Parkinson's disease*) zusammengefasst. Die genauen Pathomechanismen in der Ätiologie der Parkinson – Krankheit sind weiterhin nicht gänzlich geklärt. Eine Reihe biochemischer Prozesse stehen im Hauptfokus der bisher durchgeführten Studien. Hierzu gehören zum Beispiel Inflammationsreaktionen, oxidativer Stress, Proteinaggregation und auch ein gestörter Eisenmetabolismus. Die genetische Ursache bzw. eine genetische Prädisposition rückt in den letzten Jahren immer mehr in den Vordergrund. Seit dem ersten Nachweis über ein auslösendes Gen in der Ätiologie von Parkinson ( $\alpha$ -Synuclein Gen, PARK1) im Jahr 1997, sind in den letzten Jahrzehnten bisher 23 Gene (PARK 1 – 23) identifiziert worden, die unterschiedlich große Bedeutung für die Krankheit haben. Auch bei Parkinson-Patienten mit frühem Krankheitsbeginn (EOPD) sind viele mitverantwortliche Gene nachgewiesen worden, darunter das PARKIN, PINK1, DJ-1, ATP13A2, FBOX07 und VPS35 .

Im Jahr 2006 konnte die Arbeitsgruppe um Morgan et al. Mutationen im PLA2G6 Gen bei den beiden neurodegenerativen Erkrankungen NBIA (*neurodegeneration with brain iron accumulation*) und INAD (*infantile neuroaxonale dystrophy*) nachweisen. Wie bei EOPD-Patienten, zeigen die Patienten der Erkrankungen einen frühen Beginn der Symptome, und ein erhöhter Eisengehalt im Gehirn konnte nachgewiesen werden.

Um einen Zusammenhang zwischen dem PLA2G6 Gen und EOPD-Patienten nachzuweisen, untersuchten wir in dieser Arbeit insgesamt 268 Patienten mit EOPD und 257 gesunde Kontrollpersonen auf Mutationen. In einer ersten Gruppe von 102 EOPD-Patienten identifizierten wir insgesamt 10

Polymorphismen in den Exonen des Gens. Vier der gefundenen SNPs untersuchten wir in einer zweiten Gruppe von 166 Patienten mit EOPD. Dies führte zu der Identifikation von einem weiteren Polymorphismus im Exon 17 des Gens. Von zentralem Interesse sind die beiden heterozygoten Mutationen 2339A>G (n=2) und 2341G>A (n=1), die in 3 (1,12%) Patienten mit EOPD nachgewiesen wurden. Keiner der insgesamt 256 gesunden Kontrollpersonen wies diese Polymorphismen auf. Die beiden Missense-Mutationen liegen auf dem Exon 17 in unmittelbarer Nähe und führen in der Proteinsequenz zu dem Austausch von Asparagin zu Serin (2339A>G; N780S) beziehungsweise Alanin zu Threonin (2341G>A, A781T). Damit liegen beide im c - terminalen Teil des Gens, in welchem auch die verschiedenen katalytischen Zentren nachgewiesen wurden. Im Jahr 2009 konnte Paisan-Ruiz das PLA2G6 Gen dann als Locus für Patienten mit early-onset Parkinsonismus nachweisen. Auch andere Studien, die nach dieser und unserer Arbeit veröffentlicht wurden, konnten interessante Mutationen bei Patienten mit EOPD, Parkinson-Syndrom bzw. anderen neurodegenerativen Erkrankungen mit frühem Beginn in diesen Bereichen aufzeigen. Zusammenfassend konnten wir eine große oder sogar monogenetische Bedeutung des PLA2G6 Gens bei EOPD nicht nachweisen.

In Zusammenschau unserer Ergebnisse und der aktuellen Forschung sehen wir das PLA2G6 Gen, wahrscheinlich im Sinne eines Suszeptibilitätsgens, als einen Aspekt in der Ätiologie des EOPD. Auch wenn dies bei EOPD nur für einen kleinen Teil von Patienten zu gelten scheint, ist von einer relevanten Rolle des PLA2G6 Gens in der Pathologie neurodegenerativer Erkrankungen auszugehen. Wir halten deshalb weitere Untersuchungen des PLA2G6 Gens bei EOPD-Patienten in weiteren Arbeiten für notwendig.

## 5.2 Englisch

**Kauther, KM:**

### **The PLA2G6 Gen in patients with early-onset Parkinson's disease“**

Nearly 200 years ago Parkinson's disease (PD) was first described by James Parkinson as „shaking palsy“. Up to the present the knowledge of this neurodegenerative disease has grown continuously. Most of the time PD begins at an age around 60 years or higher, but some patients show the first symptoms already younger. The patients with an age at onset under 50 years are defined by the term „early-onset parkinson disease“ (EOPD). Although the exact pathomechanisms are still unknown, a rash of biochemical processes are well researched in the past studies. Main components are inflammation , oxidative stress , protein aggregation and high brain iron accumulation. All these processes can promote or trigger each other. However, the exact etiology of Parkinson's disease and the subtypes like EOPD are still unexplained. Since the first detection of a triggering gene in the etiology of Parkinson 's disease ( $\alpha$ -Synuclein Gen, PARK1), twenty-three genes (PARK 1 – 23) with different significance for the disease have been identified in recent decades.

In 2006, the working group around Morgan et al. was able to detect mutations in the PLA2G6 gene in patients with neurodegeneration with brain iron accumulation (NBIA) and INAD (infantile neuroaxonal dystrophy). As with EOPD patients, the patients of the diseases show an early onset of symptoms and an increased iron content in the brain could be detected .

On this account, we considered PLA2G6 a candidate gene for EOPD and analyzed a cohort of altogether 268 PD patients with early onset, comparing them to a total of 257 healthy controls.

In a first group of 102 EOPD patients we identified a total of 10 polymorphisms in the exons of the gene. Four of the found SNPs were examined in a second group of 166 patients with EOPD. This led to the identification of another polymorphism in the exon 17 of the gene. Overall, the two heterozygous mutations 2339A> G (n = 2) and 2341G> A (n = 1) were detected in 3 (1.12%) patients with EOPD. None of the 257 healthy controls showed these

polymorphisms. The two missense mutations are located on exon 17 in immediate vicinity to each other and lead to the exchange of asparagine to serine (2339A> G; N780S) and alanine to threonine (2341G> A, A781T) in the protein sequence. Thus, both are located in the c - terminal part of the gene in which different catalytic centers of the Phospholipase A2 have been detected . In 2009, Paisan-Ruiz demonstrated the PLA2G6 gene as a locus for patients with early-onset Parkinsonism (Paisan-Ruiz et al., 2009). Other studies published after this and our publication have also shown interesting mutations in the PLA2G6 gene in patients with EOPD, PD or other neurodegenerative diseases .

In summary, we could not demonstrate a large or even monogenetic significance of the PLA2G6 gene in EOPD. Nonetheless summarizing our results and current research, we consider the PLA2G6 gene a probable susceptibility gene with an impact in the etiology of EOPD. Although this seems to be the case for only a small amount of patients with EOPD, the PLA2G6 gene probably plays a significant role in the pathology of neurodegenerative diseases. Therefore, further investigations of the PLA2G6 gene in EOPD patients are necessary in further works.

## 6. Literaturverzeichnis

- Abdulwahid Arif, I. & Ahmad Khan, H. 2010. Environmental toxins and Parkinson's disease: putative roles of impaired electron transport chain and oxidative stress. *Toxicol Ind Health*, 26, 121-8.
- Ascherio, A., Lewitt, P. A., Xu, K., Eberly, S., Watts, A., Matson, W. R., Marras, C., Kieburtz, K., Rudolph, A., Bogdanov, M. B., Schwid, S. R., Tennis, M., Tanner, C. M., Beal, M. F., Lang, A. E., Oakes, D., Fahn, S., Shoulson, I. & Schwarzschild, M. A. 2009. Urate as a predictor of the rate of clinical decline in Parkinson disease. *Arch Neurol*, 66, 1460-8.
- Balsinde, J. & Balboa, M. A. 2005. Cellular regulation and proposed biological functions of group VIA calcium-independent phospholipase A2 in activated cells. *Cell Signal*, 17, 1052-62.
- Balsinde, J., Perez, R. & Balboa, M. A. 2006. Calcium-independent phospholipase A2 and apoptosis. *Biochim Biophys Acta*, 1761, 1344-50.
- Barash, Y., Calarco, J. A., Gao, W., Pan, Q., Wang, X., Shai, O., Blencowe, B. J. & Frey, B. J. 2010. Deciphering the splicing code. *Nature*, 465, 53-9.
- Beck, G., Shinzawa, K., Hayakawa, H., Baba, K., Sumi-Akamaru, H., Tsujimoto, Y. & Mochizuki, H. 2016. Progressive Axonal Degeneration of Nigrostriatal Dopaminergic Neurons in Calcium-Independent Phospholipase A2beta Knockout Mice. *PLoS One*, 11, e0153789.
- Beck, G., Sugiura, Y., Shinzawa, K., Kato, S., Setou, M., Tsujimoto, Y., Sakoda, S. & Sumi-Akamaru, H. 2011. Neuroaxonal dystrophy in calcium-independent phospholipase A2beta deficiency results from insufficient remodeling and degeneration of mitochondrial and presynaptic membranes. *J Neurosci*, 31, 11411-20.
- Becker, G., Muller, A., Braune, S., Buttner, T., Benecke, R., Greulich, W., Klein, W., Mark, G., Rieke, J. & Thumler, R. 2002. Early diagnosis of Parkinson's disease. *J Neurol*, 249 Suppl 3, III/40-8.
- Berg, D., Schweitzer, K. J., Leitner, P., Zimprich, A., Lichtner, P., Belcredi, P., Brussel, T., Schulte, C., Maass, S., Nagele, T., Wszolek, Z. K. & Gasser, T. 2005. Type and frequency of mutations in the LRRK2 gene in familial and sporadic Parkinson's disease\*. *Brain*, 128, 3000-11.

- Bohlega, S. A., Al-Mubarak, B. R., Alyemni, E. A., Abouelhoda, M., Monies, D., Mustafa, A. E., Khalil, D. S., Al Haibi, S., Abou Al-Shaar, H., Faquih, T., El-Kalioby, M., Tahir, A. I. & Al Tassan, N. A. 2016. Clinical heterogeneity of PLA2G6-related Parkinsonism: analysis of two Saudi families. *BMC Res Notes*, 9, 295.
- Bonifati, V., Rizzu, P., Van Baren, M. J., Schaap, O., Breedveld, G. J., Krieger, E., Dekker, M. C., Squitieri, F., Ibanez, P., Joosse, M., Van Dongen, J. W., Vanacore, N., Van Swieten, J. C., Brice, A., Meco, G., Van Duijn, C. M., Oostra, B. A. & Heutink, P. 2003. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science*, 299, 256-9.
- Bonifati, V., Rohe, C. F., Breedveld, G. J., Fabrizio, E., De Mari, M., Tassorelli, C., Tavella, A., Marconi, R., Nicholl, D. J., Chien, H. F., Fincati, E., Abbruzzese, G., Marini, P., De Gaetano, A., Horstink, M. W., Maat-Kievit, J. A., Sampaio, C., Antonini, A., Stocchi, F., Montagna, P., Toni, V., Guidi, M., Dalla Libera, A., Tinazzi, M., De Pandis, F., Fabbrini, G., Goldwurm, S., De Klein, A., Barbosa, E., Lopiano, L., Martignoni, E., Lamberti, P., Vanacore, N., Meco, G., Oostra, B. A. & Italian Parkinson Genetics, N. 2005. Early-onset parkinsonism associated with PINK1 mutations: frequency, genotypes, and phenotypes. *Neurology*, 65, 87-95.
- Braak, H., Braak, E., Yilmazer, D., Schultz, C., De Vos, R. A. & Jansen, E. N. 1995. Nigral and extranigral pathology in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*, 46, 15-31.
- Cadenas, E. & Davies, K. J. 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med*, 29, 222-30.
- Chartier-Harlin, M. C., Kachergus, J., Roumier, C., Mouroux, V., Douay, X., Lincoln, S., Levecque, C., Larvor, L., Andrieux, J., Hulihan, M., Waucquier, N., Defebvre, L., Amouyel, P., Farrer, M. & Destee, A. 2004. Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet*, 364, 1167-9.
- Chu, C. T. 2010. A pivotal role for PINK1 and autophagy in mitochondrial quality control: implications for Parkinson disease. *Hum Mol Genet*, 19, R28-37.
- Chung, K. K. 2006. Say NO to neurodegeneration: role of S-nitrosylation in neurodegenerative disorders. *Neurosignals*, 15, 307-13.

- Colton, C. & Wilcock, D. M. 2010. Assessing activation states in microglia. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 9, 174-91.
- Dbsnp. 2010. dbSNP Datenbank des NCBI [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/> [Accessed].
- Devos, D., Moreau, C., Devedjian, J. C., Kluza, J., Petrault, M., Laloux, C., Jonneaux, A., Ryckewaert, G., Garcon, G., Rouaix, N., Duhamel, A., Jissendi, P., Dujardin, K., Auger, F., Ravasi, L., Hopes, L., Grolez, G., Firdaus, W., Sablonniere, B., Strubi-Vuillaume, I., Zahr, N., Destee, A., Corvol, J. C., Poltl, D., Leist, M., Rose, C., Defebvre, L., Marchetti, P., Cabantchik, Z. I. & Bordet, R. 2014. Targeting chelatable iron as a therapeutic modality in Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal*, 21, 195-210.
- Devos, D., Moreau, C., Dujardin, K., Cabantchik, I., Defebvre, L. & Bordet, R. 2013. New pharmacological options for treating advanced Parkinson's disease. *Clin Ther*, 35, 1640-52.
- Di Fonzo, A., Chien, H. F., Socal, M., Giraudo, S., Tassorelli, C., Iliceto, G., Fabbrini, G., Marconi, R., Fincati, E., Abbruzzese, G., Marini, P., Squitieri, F., Horstink, M. W., Montagna, P., Libera, A. D., Stocchi, F., Goldwurm, S., Ferreira, J. J., Meco, G., Martignoni, E., Lopiano, L., Jardim, L. B., Oostra, B. A., Barbosa, E. R., Italian Parkinson Genetics, N. & Bonifati, V. 2007. ATP13A2 missense mutations in juvenile parkinsonism and young onset Parkinson disease. *Neurology*, 68, 1557-62.
- Di Fonzo, A., Dekker, M. C., Montagna, P., Baruzzi, A., Yonova, E. H., Correia Guedes, L., Szczerbinska, A., Zhao, T., Dubbel-Hulsman, L. O., Wouters, C. H., De Graaff, E., Oyen, W. J., Simons, E. J., Breedveld, G. J., Oostra, B. A., Horstink, M. W. & Bonifati, V. 2009. FBXO7 mutations cause autosomal recessive, early-onset parkinsonian-pyramidal syndrome. *Neurology*, 72, 240-5.
- Dodel, R. 2016. DGN S3-Leitlinie Idiopathisches Parkinson-Syndrom. Deutsche GESELLSCHAFT für Neurologie (DGN).
- Edvardson, S., Cinnamon, Y., Ta-Shma, A., Shaag, A., Yim, Y. I., Zenvirt, S., Jalas, C., Lesage, S., Brice, A., Taraboulos, A., Kaestner, K. H., Greene, L. E. & Elpeleg, O. 2012. A deleterious mutation in DNAJC6 encoding



- the neuronal-specific clathrin-uncoating co-chaperone auxilin, is associated with juvenile parkinsonism. *PLoS One*, 7, e36458.
- Elbaz, A. & Tranchant, C. 2007. Epidemiologic studies of environmental exposures in Parkinson's disease. *J Neurol Sci.*, 262, 37-44. Epub 2007 Jul 27.
- Emerit, J., Edeas, M. & Bricaire, F. 2004. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed Pharmacother*, 58, 39-46.
- Engel, L. A., Jing, Z., O'brien, D. E., Sun, M. & Kotzbauer, P. T. 2010. Catalytic function of PLA2G6 is impaired by mutations associated with infantile neuroaxonal dystrophy but not dystonia-parkinsonism. *PLoS One*, 5, e12897.
- Farooqui, A. A., Ong, W. Y. & Horrocks, L. A. 2006. Inhibitors of brain phospholipase A2 activity: their neuropharmacological effects and therapeutic importance for the treatment of neurologic disorders. *Pharmacol Rev*, 58, 591-620.
- Fearnley, J. M. & Lees, A. J. 1991. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain.*, 114, 2283-301.
- Fereshtehnejad, S. M., Hadizadeh, H., Farhadi, F., Shahidi, G. A., Delbari, A. & Lokk, J. 2014. Comparison of the Psychological Symptoms and Disease-Specific Quality of Life between Early- and Typical-Onset Parkinson's Disease Patients. *Parkinsons Dis*, 2014, 819260.
- Ferguson, L. W., Rajput, A. H. & Rajput, A. 2016. Early-onset vs. Late-onset Parkinson's disease: A Clinical-pathological Study. *Can J Neurol Sci*, 43, 113-9.
- Gal, S., Fridkin, M., Amit, T., Zheng, H. & Youdim, M. B. 2006. M30, a novel multifunctional neuroprotective drug with potent iron chelating and brain selective monoamine oxidase-ab inhibitory activity for Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*, 447-56.
- Galvin, J. E., Lee, V. M. & Trojanowski, J. Q. 2001. Synucleinopathies: clinical and pathological implications. *Arch Neurol*, 58, 186-90.
- Gasser, T., Hardy, J. & Mizuno, Y. 2011. Milestones in PD genetics. *Mov Disord*, 26, 1042-8.
- Gelb, D. J., Oliver, E. & Gilman, S. 1999. Diagnostic criteria for Parkinson disease. *Arch Neurol.*, 56, 33-9.

- Gene. 2017. Gene Datenbank des NCBI [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene> [Accessed].
- Gerlach, M., Hendrich, A., Hueber, R., Jost, W., Winkler, J., Woitalla, D. & Riederer, P. 2008. Early detection of Parkinson's disease: unmet needs. *Neurodegener Dis.*, 5, 137-9. Epub 2008 Mar 6.
- Gerlach, R., Riederer Et Al. 2007. Die Parkinson-Krankheit, Wien, Springer-Verlag / Wien.
- Giasson, B. I., Duda, J. E., Murray, I. V., Chen, Q., Souza, J. M., Hurtig, H. I., Ischiropoulos, H., Trojanowski, J. Q. & Lee, V. M. 2000. Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. *Science*, 290, 985-9.
- Gibb, W. R. 1986. Idiopathic Parkinson's disease and the Lewy body disorders. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 12, 223-34.
- Gilks, W. P., Abou-Sleiman, P. M., Gandhi, S., Jain, S., Singleton, A., Lees, A. J., Shaw, K., Bhatia, K. P., Bonifati, V., Quinn, N. P., Lynch, J., Healy, D. G., Holton, J. L., Revesz, T. & Wood, N. W. 2005. A common LRRK2 mutation in idiopathic Parkinson's disease. *Lancet*, 365, 415-6.
- Giri, A., Guven, G., Hanagasi, H., Hauser, A. K., Erginul-Unaltuna, N., Bilgic, B., Gurvit, H., Heutink, P., Gasser, T., Lohmann, E. & Simon-Sanchez, J. 2016. PLA2G6 Mutations Related to Distinct Phenotypes: A New Case with Early-onset Parkinsonism. *Tremor Other Hyperkinet Mov (N Y)*, 6, 363.
- Glynn, P. 2013. Neuronal phospholipid deacylation is essential for axonal and synaptic integrity. *Biochim Biophys Acta*, 1831, 633-41.
- Goedert, M. 2001. Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*, 2, 492-501.
- Goetz, C. G., Tilley, B. C., Shaftman, S. R., Stebbins, G. T., Fahn, S., Martinez-Martin, P., Poewe, W., Sampaio, C., Stern, M. B., Dodel, R., Dubois, B., Holloway, R., Jankovic, J., Kulisevsky, J., Lang, A. E., Lees, A., Leurgans, S., Lewitt, P. A., Nyenhuis, D., Olanow, C. W., Rascol, O., Schrag, A., Teresi, J. A., Van Hilten, J. J. & Lapelle, N. 2008. Movement Disorder Society-sponsored revision of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS): scale presentation and clinimetric testing results. *Mov Disord*, 23, 2129-70.

- Gotz, M. E., Double, K., Gerlach, M., Youdim, M. B. & Riederer, P. 2004. The relevance of iron in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci*, 1012, 193-208.
- Gregory, A., Westaway, S. K., Holm, I. E., Kotzbauer, P. T., Hogarth, P., Sonek, S., Coryell, J. C., Nguyen, T. M., Nardocci, N., Zorzi, G., Rodriguez, D., Desguerre, I., Bertini, E., Simonati, A., Levinson, B., Dias, C., Barbot, C., Carrilho, I., Santos, M., Malik, I., Gitschier, J. & Hayflick, S. J. 2008. Neurodegeneration associated with genetic defects in phospholipase A(2). *Neurology*, 71, 1402-9.
- Gui, Y. X., Xu, Z. P., Wen, L., Liu, H. M., Zhao, J. J. & Hu, X. Y. 2013. Four novel rare mutations of PLA2G6 in Chinese population with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, 19, 21-6.
- Guo, X., Song, W., Chen, K., Chen, X., Zheng, Z., Cao, B., Huang, R., Zhao, B., Wu, Y. & Shang, H. F. 2013. Gender and onset age-related features of non-motor symptoms of patients with Parkinson's disease--a study from Southwest China. *Parkinsonism Relat Disord*, 19, 961-5.
- Gustavsson, A., Svensson, M., Jacobi, F., Allgulander, C., Alonso, J., Beghi, E., Dodel, R., Ekman, M., Faravelli, C., Fratiglioni, L., Gannon, B., Jones, D. H., Jennum, P., Jordanova, A., Jonsson, L., Karampampa, K., Knapp, M., Kobelt, G., Kurth, T., Lieb, R., Linde, M., Ljungcrantz, C., Maercker, A., Melin, B., Moscarelli, M., Musayev, A., Norwood, F., Preisig, M., Pugliatti, M., Rehm, J., Salvador-Carulla, L., Schlehofer, B., Simon, R., Steinhausen, H. C., Stovner, L. J., Vallat, J. M., Van Den Bergh, P., Van Os, J., Vos, P., Xu, W., Wittchen, H. U., Jonsson, B. & Olesen, J. 2011. Cost of disorders of the brain in Europe 2010. *Eur Neuropsychopharmacol*, 21, 718-79.
- Hartmann, A., Hunot, S. & Hirsch, E. C. 2003. Inflammation and dopaminergic neuronal loss in Parkinson's disease: a complex matter. *Exp Neurol*, 184, 561-4.
- Hedrich, K., Djarmati, A., Schafer, N., Hering, R., Wellenbrock, C., Weiss, P. H., Hilker, R., Vieregge, P., Ozelius, L. J., Heutink, P., Bonifati, V., Schwinger, E., Lang, A. E., Noth, J., Bressman, S. B., Pramstaller, P. P., Riess, O. & Klein, C. 2004. DJ-1 (PARK7) mutations are less frequent

- than Parkin (PARK2) mutations in early-onset Parkinson disease. *Neurology*, 62, 389-94.
- Hindle, J. V. 2010. Ageing, neurodegeneration and Parkinson's disease. *Age Ageing*, 39, 156-61.
- Hirsch, E. C., Breidert, T., Rousselet, E., Hunot, S., Hartmann, A. & Michel, P. 2003. The role of glial reaction and inflammation in Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci*, 991, 214-28.
- Howitt, J., Gysbers, A. M., Ayton, S., Carew-Jones, F., Putz, U., Finkelstein, D. I., Halliday, G. M. & Tan, S. S. 2014. Increased Ndfip1 in the substantia nigra of Parkinsonian brains is associated with elevated iron levels. *PLoS One*, 9, e87119.
- Hughes, A. J., Daniel, S. E., Kilford, L. & Lees, A. J. 1992. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 55, 181-4.
- Jankovic, J. 2008. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 79, 368-76.
- Jellinger, K. A. 1991. Pathology of Parkinson's disease. Changes other than the nigrostriatal pathway. *Mol Chem Neuropathol*, 14, 153-97.
- Jenkins, C. M., Wolf, M. J., Mancuso, D. J. & Gross, R. W. 2001. Identification of the calmodulin-binding domain of recombinant calcium-independent phospholipase A2beta. implications for structure and function. *J Biol Chem*, 276, 7129-35.
- Kalda, A., Yu, L., Oztas, E. & Chen, J. F. 2006. Novel neuroprotection by caffeine and adenosine A(2A) receptor antagonists in animal models of Parkinson's disease. *J Neurol Sci*, 248, 9-15.
- Karkheiran, S., Shahidi, G. A., Walker, R. H. & Paisan-Ruiz, C. 2015. PLA2G6-associated Dystonia-Parkinsonism: Case Report and Literature Review. *Tremor Other Hyperkinet Mov (N Y)*, 5, 317.
- Kauther, K. M., Hoft, C., Rissling, I., Oertel, W. H. & Möller, J. C. 2011. The PLA2G6 gene in early-onset Parkinson's disease. *Mov Disord*, 26, 2415-7.
- Kim, Y. J., Lyoo, C. H., Hong, S., Kim, N. Y. & Lee, M. S. 2015. Neuroimaging studies and whole exome sequencing of PLA2G6-associated

- neurodegeneration in a family with intrafamilial phenotypic heterogeneity. *Parkinsonism Relat Disord*, 21, 402-6.
- Kinghorn, K. J., Castillo-Quan, J. I., Bartolome, F., Angelova, P. R., Li, L., Pope, S., Cocheme, H. M., Khan, S., Asghari, S., Bhatia, K. P., Hardy, J., Abramov, A. Y. & Partridge, L. 2015. Loss of PLA2G6 leads to elevated mitochondrial lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction. *Brain*, 138, 1801-16.
- Kleinhenz, J., Vieregge, P., Fassel, H. & Jorg, J. 1990. [The prevalence of Parkinson disease in West Germany--are general practice data a suitable survey instrument?]. *Offentl Gesundheitswes*, 52, 181-90.
- Koroglu, C., Baysal, L., Cetinkaya, M., Karasoy, H. & Tolun, A. 2013. DNAJC6 is responsible for juvenile parkinsonism with phenotypic variability. *Parkinsonism Relat Disord*, 19, 320-4.
- Krebiehl, G., Ruckerbauer, S., Burbulla, L. F., Kieper, N., Maurer, B., Waak, J., Wolburg, H., Gizatullina, Z., Gellerich, F. N., Voitalla, D., Riess, O., Kahle, P. J., Proikas-Cezanne, T. & Kruger, R. 2010. Reduced basal autophagy and impaired mitochondrial dynamics due to loss of Parkinson's disease-associated protein DJ-1. *PLoS One*, 5, e9367.
- Krebs, C. E., Karkheiran, S., Powell, J. C., Cao, M., Makarov, V., Darvish, H., Di Paolo, G., Walker, R. H., Shahidi, G. A., Buxbaum, J. D., De Camilli, P., Yue, Z. & Paisan-Ruiz, C. 2013. The Sac1 domain of SYNJ1 identified mutated in a family with early-onset progressive Parkinsonism with generalized seizures. *Hum Mutat*, 34, 1200-7.
- Kumazawa, R., Tomiyama, H., Li, Y., Imamichi, Y., Funayama, M., Yoshino, H., Yokochi, F., Fukusako, T., Takehisa, Y., Kashiwara, K., Kondo, T., Elibol, B., Bostantjopoulou, S., Toda, T., Takahashi, H., Yoshii, F., Mizuno, Y. & Hattori, N. 2008. Mutation analysis of the PINK1 gene in 391 patients with Parkinson disease. *Arch Neurol*, 65, 802-8.
- Kurian, M. A., Morgan, N. V., Macpherson, L., Foster, K., Peake, D., Gupta, R., Philip, S. G., Hendriksz, C., Morton, J. E., Kingston, H. M., Rosser, E. M., Wassmer, E., Gissen, P. & Maher, E. R. 2008. Phenotypic spectrum of neurodegeneration associated with mutations in the PLA2G6 gene (PLAN). *Neurology*, 70, 1623-9.

- Lan, J. & Jiang, D. H. 1997. Excessive iron accumulation in the brain: a possible potential risk of neurodegeneration in Parkinson's disease. *J Neural Transm*, 104, 649-60.
- Lees, A. J., Selikhova, M., Andrade, L. A. & Duyckaerts, C. 2008. The black stuff and Konstantin Nikolaevich Tretiakoff. *Mov Disord*, 23, 777-83.
- Levy, G. 2007. The relationship of Parkinson disease with aging. *Arch Neurol*, 64, 1242-6.
- Lin, T. K., Liou, C. W., Chen, S. D., Chuang, Y. C., Tiao, M. M., Wang, P. W., Chen, J. B. & Chuang, J. H. 2009. Mitochondrial dysfunction and biogenesis in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Chang Gung Med J*, 32, 589-99.
- Liu, P., Feng, T., Wang, Y. J., Zhang, X. & Chen, B. 2011. Clinical heterogeneity in patients with early-stage Parkinson's disease: a cluster analysis. *J Zhejiang Univ Sci B*, 12, 694-703.
- Luo, L. Z., Xu, Q., Guo, J. F., Wang, L., Shi, C. H., Wei, J. H., Long, Z. G., Pan, Q., Tang, B. S., Xia, K. & Yan, X. X. 2010. FBXO7 gene mutations may be rare in Chinese early-onset Parkinsonism patients. *Neurosci Lett*, 482, 86-9.
- Lynch-Day, M. A., Mao, K., Wang, K., Zhao, M. & Klionsky, D. J. 2012. The role of autophagy in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2, a009357.
- Macedo, M. G., Verbaan, D., Fang, Y., Van Rooden, S. M., Visser, M., Anar, B., Uras, A., Groen, J. L., Rizzu, P., Van Hilten, J. J. & Heutink, P. 2009. Genotypic and phenotypic characteristics of Dutch patients with early onset Parkinson's disease. *Mov Disord*, 24, 196-203.
- Marras, C. & Lang, A. 2013. Parkinson's disease subtypes: lost in translation? *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 84, 409-15.
- Martin, W. R., Wieler, M. & Gee, M. 2008. Midbrain iron content in early Parkinson disease: a potential biomarker of disease status. *Neurology*, 70, 1411-7.
- Mayeux, R., Denaro, J., Hemenegildo, N., Marder, K., Tang, M. X., Cote, L. J. & Stern, Y. 1992. A population-based investigation of Parkinson's disease with and without dementia. Relationship to age and gender. *Arch Neurol*, 49, 492-7.

- Mcgeer, P. L. & Mcgeer, E. G. 2008. Glial reactions in Parkinson's disease. *Mov Disord*, 23, 474-83.
- Michaeli, S., Oz, G., Sorce, D. J., Garwood, M., Ugurbil, K., Majestic, S. & Tuite, P. 2007. Assessment of brain iron and neuronal integrity in patients with Parkinson's disease using novel MRI contrasts. *Mov Disord*, 22, 334-40.
- Möller, J. C., Leinweber, B., Rissling, I., Oertel, W. H., Bandmann, O. & Schmidt, H. H. 2006. Prevalence of the H1069Q mutation in ATP7B in discordant pairs with early-onset Parkinson's disease. *Mov Disord*, 21, 1789-90.
- Möller, J. C., Rissling, I., Mylius, V., Hoft, C., Eggert, K. M. & Oertel, W. H. 2008. The prevalence of the G2019S and R1441C/G/H mutations in LRRK2 in German patients with Parkinson's disease. *Eur J Neurol*, 15, 743-5.
- Moore, D. J. 2006. Parkin: a multifaceted ubiquitin ligase. *Biochem Soc Trans*, 34, 749-53.
- Morgan, N. V., Westaway, S. K., Morton, J. E., Gregory, A., Gissen, P., Sonek, S., Cangul, H., Coryell, J., Canham, N., Nardocci, N., Zorzi, G., Pasha, S., Rodriguez, D., Desguerre, I., Mubaidin, A., Bertini, E., Trembath, R. C., Simonati, A., Schanen, C., Johnson, C. A., Levinson, B., Woods, C. G., Wilmot, B., Kramer, P., Gitschier, J., Maher, E. R. & Hayflick, S. J. 2006. PLA2G6, encoding a phospholipase A2, is mutated in neurodegenerative disorders with high brain iron. *Nat Genet*, 38, 752-4.
- Moscovitz, O., Ben-Nissan, G., Fainer, I., Pollack, D., Mizrahi, L. & Sharon, M. 2015. The Parkinson's-associated protein DJ-1 regulates the 20S proteasome. *Nat Commun*, 6, 6609.
- Munch, G., Luth, H. J., Wong, A., Arendt, T., Hirsch, E., Ravid, R. & Riederer, P. 2000. Crosslinking of alpha-synuclein by advanced glycation endproducts--an early pathophysiological step in Lewy body formation? *J Chem Neuroanat*, 20, 253-7.
- Murakami, M. & Kudo, I. 2002. Phospholipase A2. *J Biochem*, 131, 285-92.
- Muralikrishna Adibhatla, R. & Hatcher, J. F. 2006. Phospholipase A2, reactive oxygen species, and lipid peroxidation in cerebral ischemia. *Free Radic Biol Med*, 40, 376-87.

- Najim Al-Din, A. S., Wriekat, A., Mubaidin, A., Dasouki, M. & Hiari, M. 1994. Pallido-pyramidal degeneration, supranuclear upgaze paresis and dementia: Kufor-Rakeb syndrome. *Acta Neurol Scand*, 89, 347-52.
- Nichols, W. C., Pankratz, N., Hernandez, D., Paisan-Ruiz, C., Jain, S., Halter, C. A., Michaels, V. E., Reed, T., Rudolph, A., Shults, C. W., Singleton, A., Foroud, T. & Parkinson Study Group, P. I. 2005. Genetic screening for a single common LRRK2 mutation in familial Parkinson's disease. *Lancet*, 365, 410-2.
- Nucleotide-Blast. Nucleotide BLAST Programm des NCBI [Online]. Available: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov> [Accessed 2005 - 2010].
- Nuytemans, K., Theuns, J., Cruts, M. & Van Broeckhoven, C. 2010. Genetic etiology of Parkinson disease associated with mutations in the SNCA, PARK2, PINK1, PARK7, and LRRK2 genes: a mutation update. *Hum Mutat*, 31, 763-80.
- Oertel W, D. G., Poewe W. 2012. Parkinson-Syndrome und andere Bewegungsstörungen., Stuttgart, Thieme Verlag.
- Olanow, C. W. 2007. The pathogenesis of cell death in Parkinson's disease--2007. *Mov Disord*, 22 Suppl 17, S335-42.
- Olgiati, S., De Rosa, A., Quadri, M., Criscuolo, C., Breedveld, G. J., Picillo, M., Pappata, S., Quarantelli, M., Barone, P., De Michele, G. & Bonifati, V. 2014. PARK20 caused by SYNJ1 homozygous Arg258Gln mutation in a new Italian family. *Neurogenetics*, 15, 183-8.
- Olgiati, S., Quadri, M., Fang, M., Rood, J. P., Saute, J. A., Chien, H. F., Bouwkamp, C. G., Graafland, J., Minneboo, M., Breedveld, G. J., Zhang, J., Verheijen, F. W., Boon, A. J., Kievit, A. J., Jardim, L. B., Mandemakers, W., Barbosa, E. R., Rieder, C. R., Leenders, K. L., Wang, J. & Bonifati, V. 2016. DNAJC6 Mutations Associated With Early-Onset Parkinson's Disease. *Ann Neurol*, 79, 244-56.
- Ono, K., Hirohata, M. & Yamada, M. 2007. Anti-fibrillogenic and fibril-destabilizing activity of nicotine in vitro: implications for the prevention and therapeutics of Lewy body diseases. *Exp Neurol*, 205, 414-24.
- Paisan-Ruiz, C., Bhatia, K. P., Li, A., Hernandez, D., Davis, M., Wood, N. W., Hardy, J., Houlden, H., Singleton, A. & Schneider, S. A. 2009.



- Characterization of PLA2G6 as a locus for dystonia-parkinsonism. *Ann Neurol*, 65, 19-23.
- Paisan-Ruiz, C., Jain, S., Evans, E. W., Gilks, W. P., Simon, J., Van Der Brug, M., Lopez De Munain, A., Aparicio, S., Gil, A. M., Khan, N., Johnson, J., Martinez, J. R., Nicholl, D., Carrera, I. M., Pena, A. S., De Silva, R., Lees, A., Marti-Masso, J. F., Perez-Tur, J., Wood, N. W. & Singleton, A. B. 2004. Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron*, 44, 595-600.
- Paisan-Ruiz, C., Li, A., Schneider, S. A., Holton, J. L., Johnson, R., Kidd, D., Chataway, J., Bhatia, K. P., Lees, A. J., Hardy, J., Revesz, T. & Houlden, H. 2012. Widespread Lewy body and tau accumulation in childhood and adult onset dystonia-parkinsonism cases with PLA2G6 mutations. *Neurobiol Aging*, 33, 814-23.
- Parkinson, J. 1817. An Essay on the Shaking Palsy. In: SHERWOOD, N., AND JONES (ed.). London.
- Payami, H., Zarepari, S., James, D. & Nutt, J. 2002. Familial aggregation of Parkinson disease: a comparative study of early-onset and late-onset disease. *Arch Neurol*, 59, 848-50.
- Periquet, M., Latouche, M., Lohmann, E., Rawal, N., De Michele, G., Ricard, S., Teive, H., Fraix, V., Vidailhet, M., Nicholl, D., Barone, P., Wood, N. W., Raskin, S., Deleuze, J. F., Agid, Y., Durr, A., Brice, A., French Parkinson's Disease Genetics Study, G. & European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's, D. 2003. Parkin mutations are frequent in patients with isolated early-onset parkinsonism. *Brain*, 126, 1271-8.
- Poewe, W. 2008. Non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Eur J Neurol.*, 15, 14-20.
- Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E. S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W. G., Lazzarini, A. M., Duvoisin, R. C., Di Iorio, G., Golbe, L. I. & Nussbaum, R. L. 1997. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, 276, 2045-7.

- Pott Godoy, M. C., Tarelli, R., Ferrari, C. C., Sarchi, M. I. & Pitossi, F. J. 2008. Central and systemic IL-1 exacerbates neurodegeneration and motor symptoms in a model of Parkinson's disease. *Brain*, 131, 1880-94.
- Pridgeon, J. W., Olzmann, J. A., Chin, L. S. & Li, L. 2007. PINK1 protects against oxidative stress by phosphorylating mitochondrial chaperone TRAP1. *PLoS Biol*, 5, e172.
- Quadri, M., Fang, M., Picillo, M., Olgiati, S., Breedveld, G. J., Graafland, J., Wu, B., Xu, F., Erro, R., Amboni, M., Pappata, S., Quarantelli, M., Annesi, G., Quattrone, A., Chien, H. F., Barbosa, E. R., Oostra, B. A., Barone, P., Wang, J. & Bonifati, V. 2013. Mutation in the SYNJ1 gene associated with autosomal recessive, early-onset Parkinsonism. *Hum Mutat*, 34, 1208-15.
- Quik, M. 2004. Smoking, nicotine and Parkinson's disease. *Trends Neurosci*, 27, 561-8.
- Quinn, N., Critchley, P. & Marsden, C. D. 1987. Young onset Parkinson's disease. *Mov Disord*, 2, 73-91.
- Ramirez, A., Heimbach, A., Grundemann, J., Stiller, B., Hampshire, D., Cid, L. P., Goebel, I., Mubaidin, A. F., Wriekat, A. L., Roeper, J., Al-Din, A., Hillmer, A. M., Karsak, M., Liss, B., Woods, C. G., Behrens, M. I. & Kubisch, C. 2006. Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nat Genet*, 38, 1184-91.
- Reynolds, A. D., Glanzer, J. G., Kadiu, I., Ricardo-Dukelow, M., Chaudhuri, A., Ciborowski, P., Cerny, R., Gelman, B., Thomas, M. P., Mosley, R. L. & Gendelman, H. E. 2008. Nitrated alpha-synuclein-activated microglial profiling for Parkinson's disease. *J Neurochem*, 104, 1504-25.
- Reynolds, M. R., Berry, R. W. & Binder, L. I. 2007. Nitration in neurodegeneration: deciphering the "Hows" "nYs". *Biochemistry*, 46, 7325-36.
- Rissling, I., Bandmann O, Höft T, Burmester R, Oertel Wh, Möller C 2004. Prevalence of UCHL1, DJ1 and NR4A2 gene mutations in young-onset Parkinson's disease (YOPD) patients. 8th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders/ Rome.

- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. & Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230, 1350-4.
- Sambrook, M. T. F. E. F. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor, NY.
- Sawada, M., Imamura, K. & Nagatsu, T. 2006. Role of cytokines in inflammatory process in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*, 373-81.
- Schapira, A. H. 1993. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Adv Neurol*, 60, 288-91.
- Schneider, S. A., Bhatia, K. P. & Hardy, J. 2009. Complicated recessive dystonia parkinsonism syndromes. *Mov Disord*, 24, 490-9.
- Schneider, S. A., Paisan-Ruiz, C., Quinn, N. P., Lees, A. J., Houlden, H., Hardy, J. & Bhatia, K. P. 2010. ATP13A2 mutations (PARK9) cause neurodegeneration with brain iron accumulation. *Mov Disord*, 25, 979-84.
- Schrag, A. & Schott, J. M. 2006. Epidemiological, clinical, and genetic characteristics of early-onset parkinsonism. *Lancet Neurol*, 5, 355-63.
- Schulz-Schaeffer, W. J. 2010. The synaptic pathology of alpha-synuclein aggregation in dementia with Lewy bodies, Parkinson's disease and Parkinson's disease dementia. *Acta Neuropathol*, 120, 131-43.
- Shannon, K. M., Keshavarzian, A., Mutlu, E., Dodiya, H. B., Daian, D., Jaglin, J. A. & Kordower, J. H. 2012. Alpha-synuclein in colonic submucosa in early untreated Parkinson's disease. *Mov Disord*, 27, 709-15.
- Shi, C. H., Tang, B. S., Wang, L., Lv, Z. Y., Wang, J., Luo, L. Z., Shen, L., Jiang, H., Yan, X. X., Pan, Q., Xia, K. & Guo, J. F. 2011. PLA2G6 gene mutation in autosomal recessive early-onset parkinsonism in a Chinese cohort. *Neurology*, 77, 75-81.
- Shibata, N. & Kobayashi, M. 2008. [The role for oxidative stress in neurodegenerative diseases]. *Brain Nerve*, 60, 157-70.
- Shindou, H., Hishikawa, D., Harayama, T., Eto, M. & Shimizu, T. 2013. Generation of membrane diversity by lysophospholipid acyltransferases. *J Biochem*, 154, 21-8.

- Spira, P. J., Sharpe, D. M., Halliday, G., Cavanagh, J. & Nicholson, G. A. 2001. Clinical and pathological features of a Parkinsonian syndrome in a family with an Ala53Thr alpha-synuclein mutation. *Ann Neurol*, 49, 313-9.
- Squitti, R. 2012. Metals in Alzheimer's disease: a systemic perspective. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 17, 451-72.
- Stone, D. K., Reynolds, A. D., Mosley, R. L. & Gendelman, H. E. 2009. Innate and adaptive immunity for the pathobiology of Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal*, 11, 2151-66.
- Sulzer, D. 2007. Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease. *Trends Neurosci*, 30, 244-50.
- Sumi-Akamaru, H., Beck, G., Kato, S. & Mochizuki, H. 2015. Neuroaxonal dystrophy in PLA2G6 knockout mice. *Neuropathology*, 35, 289-302.
- Sun, G. Y., Xu, J., Jensen, M. D. & Simonyi, A. 2004. Phospholipase A2 in the central nervous system: implications for neurodegenerative diseases. *J Lipid Res*, 45, 205-13.
- Sun, G. Y., Xu, J., Jensen, M. D., Yu, S., Wood, W. G., Gonzalez, F. A., Simonyi, A., Sun, A. Y. & Weisman, G. A. 2005. Phospholipase A2 in astrocytes: responses to oxidative stress, inflammation, and G protein-coupled receptor agonists. *Mol Neurobiol*, 31, 27-41.
- Tan, E. K., Ho, P., Tan, L., Prakash, K. M. & Zhao, Y. 2010. PLA2G6 mutations and Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 67, 148.
- Tang, H., Huang, J., Nie, K., Gan, R., Wang, L., Zhao, J., Huang, Z., Zhang, Y. & Wang, L. 2016. Cognitive profile of Parkinson's disease patients: a comparative study between early-onset and late-onset Parkinson's disease. *Int J Neurosci*, 126, 227-34.
- Thümler, R. 2002. *Morbus Parkinson, Ein Leitfadens für Klinik und Praxis*, Berlin, Springer.
- Tian, J. Y., Tang, B. S., Shi, C. H., Lv, Z. Y., Li, K., Yu, R. L., Shen, L., Yan, X. X. & Guo, J. F. 2012. Analysis of PLA2G6 gene mutation in sporadic early-onset parkinsonism patients from Chinese population. *Neurosci Lett*, 514, 156-8.
- Tomiyaama, H., Yoshino, H., Ogaki, K., Li, L., Yamashita, C., Li, Y., Funayama, M., Sasaki, R., Kokubo, Y., Kuzuhara, S. & Hattori, N. 2011. PLA2G6 variant in Parkinson's disease. *J Hum Genet*, 56, 401-3.

- Tsang, A. H. & Chung, K. K. 2009. Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta*, 1792, 643-50.
- Uversky, V. N., Li, J. & Fink, A. L. 2001. Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. A possible molecular link between Parkinson's disease and heavy metal exposure. *J Biol Chem*, 276, 44284-96.
- Valente, E. M., Abou-Sleiman, P. M., Caputo, V., Muqit, M. M., Harvey, K., Gispert, S., Ali, Z., Del Turco, D., Bentivoglio, A. R., Healy, D. G., Albanese, A., Nussbaum, R., Gonzalez-Maldonado, R., Deller, T., Salvi, S., Cortelli, P., Gilks, W. P., Latchman, D. S., Harvey, R. J., Dallapiccola, B., Auburger, G. & Wood, N. W. 2004a. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science*, 304, 1158-60.
- Valente, E. M., Salvi, S., Ialongo, T., Marongiu, R., Elia, A. E., Caputo, V., Romito, L., Albanese, A., Dallapiccola, B. & Bentivoglio, A. R. 2004b. PINK1 mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism. *Ann Neurol*, 56, 336-41.
- Van Rooden, S. M., Colas, F., Martinez-Martin, P., Visser, M., Verbaan, D., Marinus, J., Chaudhuri, R. K., Kok, J. N. & Van Hilten, J. J. 2011. Clinical subtypes of Parkinson's disease. *Mov Disord*, 26, 51-8.
- Virmani, T., Thenganatt, M. A., Goldman, J. S., Kubisch, C., Greene, P. E. & Alcalay, R. N. 2014. Oculogyric crises induced by levodopa in PLA2G6 parkinsonism-dystonia. *Parkinsonism Relat Disord*, 20, 245-7.
- Von Campenhausen, S., Bornschein, B., Wick, R., Botzel, K., Sampaio, C., Poewe, W., Oertel, W., Siebert, U., Berger, K. & Dodel, R. 2005. Prevalence and incidence of Parkinson's disease in Europe. *Eur Neuropsychopharmacol*, 15, 473-90.
- Wakabayashi, K., Mori, F., Tanji, K., Orimo, S. & Takahashi, H. 2010. Involvement of the peripheral nervous system in synucleinopathies, tauopathies and other neurodegenerative proteinopathies of the brain. *Acta Neuropathol*, 120, 1-12.
- Weiner, W. J. 2006. Motor fluctuations in Parkinson's disease. *Rev Neurol Dis*, 3, 101-8.

- Weintraub, D., Comella, C. L. & Horn, S. 2008. Parkinson's disease--Part 1: Pathophysiology, symptoms, burden, diagnosis, and assessment. *Am J Manag Care.*, 14, S40-8.
- Wesemann, W., Blaschke, S., Solbach, M., Grote, C., Clement, H. W. & Riederer, P. 1994. Intranigral injected iron progressively reduces striatal dopamine metabolism. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect*, 8, 209-14.
- Wickremaratchi, M. M., Ben-Shlomo, Y. & Morris, H. R. 2009. The effect of onset age on the clinical features of Parkinson's disease. *Eur J Neurol*, 16, 450-6.
- Wickremaratchi, M. M., Knipe, M. D., Sastry, B. S., Morgan, E., Jones, A., Salmon, R., Weiser, R., Moran, M., Davies, D., Ebenezer, L., Raha, S., Robertson, N. P., Butler, C. C., Ben-Shlomo, Y. & Morris, H. R. 2011. The motor phenotype of Parkinson's disease in relation to age at onset. *Mov Disord*, 26, 457-63.
- Williams, D. R., Hadeed, A., Al-Din, A. S., Wreikat, A. L. & Lees, A. J. 2005. Kufor Rakeb disease: autosomal recessive, levodopa-responsive parkinsonism with pyramidal degeneration, supranuclear gaze palsy, and dementia. *Mov Disord*, 20, 1264-71.
- Winquist, A., Steenland, K. & Shankar, A. 2010. Higher serum uric acid associated with decreased Parkinson's disease prevalence in a large community-based survey. *Mov Disord*, 25, 932-6.
- Wirdefeldt, K., Adami, H. O., Cole, P., Trichopoulos, D. & Mandel, J. 2011. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *Eur J Epidemiol*, 26 Suppl 1, S1-58.
- Wooten, G. F., Currie, L. J., Bovbjerg, V. E., Lee, J. K. & Patrie, J. 2004. Are men at greater risk for Parkinson's disease than women? *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 75, 637-9.
- Xie, F., Cen, Z., Ouyang, Z., Wu, S., Xiao, J. & Luo, W. 2015. Homozygous p.D331Y mutation in PLA2G6 in two patients with pure autosomal-recessive early-onset parkinsonism: further evidence of a fourth phenotype of PLA2G6-associated neurodegeneration. *Parkinsonism Relat Disord*, 21, 420-2.

- Ylikotila, P., Tiirikka, T., Moilanen, J. S., Kaariainen, H., Marttila, R. & Majamaa, K. 2015. Epidemiology of early-onset Parkinson's disease in Finland. *Parkinsonism Relat Disord*, 21, 938-42.
- Yoshino, H., Tomiyama, H., Tachibana, N., Ogaki, K., Li, Y., Funayama, M., Hashimoto, T., Takashima, S. & Hattori, N. 2010. Phenotypic spectrum of patients with PLA2G6 mutation and PARK14-linked parkinsonism. *Neurology*, 75, 1356-61.
- Zhang, X., Zhou, J. Y., Chin, M. H., Schepmoes, A. A., Petyuk, V. A., Weitz, K. K., Petritis, B. O., Monroe, M. E., Camp, D. G., Wood, S. A., Melega, W. P., Bigelow, D. J., Smith, D. J., Qian, W. J. & Smith, R. D. 2010. Region-specific protein abundance changes in the brain of MPTP-induced Parkinson's disease mouse model. *J Proteome Res*, 9, 1496-509.
- Zhou, M. Z., Gan, J., Wei, Y. R., Ren, X. Y., Chen, W. & Liu, Z. G. 2013. The association between non-motor symptoms in Parkinson's disease and age at onset. *Clin Neurol Neurosurg*, 115, 2103-7.
- Zhou, Q., Yen, A., Rymarczyk, G., Asai, H., Trengrove, C., Aziz, N., Kirber, M. T., Mostoslavsky, G., Ikezu, T., Wolozin, B. & Bolotina, V. M. 2016. Impairment of PARK14-dependent Ca(2+) signalling is a novel determinant of Parkinson's disease. *Nat Commun*, 7, 10332.
- Zhu, J. & Chu, C. T. 2010. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *J Alzheimers Dis*, 20 Suppl 2, S325-34.
- Zibetti, M., Torre, E., Cinquepalmi, A., Rosso, M., Ducati, A., Bergamasco, B., Lanotte, M. & Lopiano, L. 2007. Motor and nonmotor symptom follow-up in parkinsonian patients after deep brain stimulation of the subthalamic nucleus. *Eur Neurol.*, 58, 218-23. Epub 2007 Sep 7.

## 7. Anhang

### 7.1 Kriterien der UK Parkinson's Disease Society Brain Bank

#### UK PARKINSON'S DISEASE SOCIETY BRAIN BANK CLINICAL DIAGNOSTIC CRITERIA\*

##### Step 1. Diagnosis of Parkinsonian Syndrome

- Bradykinesia
- At least one of the following
  - Muscular rigidity
  - 4-6 Hz rest tremor
  - postural instability not caused by primary visual, vestibular, cerebellar, or proprioceptive dysfunction

##### Step 2 Exclusion criteria for Parkinson's disease

- history of repeated strokes with stepwise progression of parkinsonian features
- history of repeated head injury
- history of definite encephalitis
- oculogyric crises
- neuroleptic treatment at onset of symptoms
- more than one affected relative
- sustained remission
- strictly unilateral features after 3 years
- supranuclear gaze palsy
- cerebellar signs
- early severe autonomic involvement
- early severe dementia with disturbances of memory, language, and praxis
- Babinski sign
- presence of cerebral tumor or communication hydrocephalus on imaging study
- negative response to large doses of levodopa in absence of malabsorption
- MPTP exposure

##### Step 3 supportive prospective positive criteria for Parkinson's disease

Three or more required for diagnosis of definite Parkinson's disease in combination with step one

- Unilateral onset
- Rest tremor present
- Progressive disorder
- Persistent asymmetry affecting side of onset most
- Excellent response (70-100%) to levodopa
- Severe levodopa-induced chorea
- Levodopa response for 5 years or more
- Clinical course of ten years or more

*\*From: Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease. A clinico-pathological study of 100 cases. JNNP 1992;55:181-184.*



## 7.2 Tabellarischer Lebenslauf

GEBURT: 11.12.1981 in Wuppertal, Deutschland

[illegible]

Seit 05/2020

Arbeit als Facharzt/Päd. Pneumologe und Weiterbildung  
Allergologie (Praxis „Pädiatrisches Forum“, Bielefeld)

Kai Michael Kautner

### **7.3 Verzeichnis der akademischen Lehrer**

Meine akademischen Lehrer waren folgende Damen und Herren der Philipps – Universität Marburg:

#### Vorklinischer Studienabschnitt:

Aumüller, Basler, Cetin, Daut, del Rey, Eilers, Feuser, Gemsa, Geus, Grundmann, Hasilik, Kern, Koolman, Lang, Lemansky, Lill, Liss, Löffler, Mandrek, Mueller, Neumüller, Rausch, Röhm, Röper, Seifert, Seitz, Suske, Steininger, Sundermeyer, Weihe, Westermann

#### Klinischer Studienabschnitt:

Aigner, Al-Fakhri, Alter, Arnold, Bals, Barth, Baum, Bauer, Baumann, Berger, Bien, Boekhoff, Büch, Burchert, Christiansen, Czubayko, Dominguez, Donner-Banzhoff, Engenhardt-Cabillic, Fuchs-Winkelmann, Funck, Geks, Görg, Gress, Grimm, Gudermann, Happle, Hellwig, Hertl, Herzum, Höffken, Hofman, Hörle, Hoyer, Juncas, Kann, Kill, Klenk, Klose, Köhler, Köhler, Krieg, Kroll, Kuhlmann, Loff, Lohoff, Maier, Maisch, Mennel, Mittag, Mederos, Moll, Moosdorf, Möller, Müller, Neubauer, Nockher, Oeffner, Oertel, Pagenstecher, Plant, Printz, Renz, Rothmund, Ruchholtz, Schäfer, Schäfer, Schmitt, Schofer, Sesterhenn, Sommer, Stief, Strauch, Vogelmeier, Wagner, Werner, Wulf, Yu, Zemlin

## 7.4 Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt an erster Stelle meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. med. J.C. Möller der mir früh mit der Auswahl dieser Dr. Arbeit geholfen, zu jeder Zeit ein offenes Ohr für Fragen und immer Zeit für fachliche Diskussionen hatte. Besonders in der Zeit wo er bereits beruflich nicht mehr in Deutschland weilte, konnte ich immer auf seine Unterstützung bauen.

Herrn Prof. W.H. Oertel als damaliger Direktor der Klinik für Neurologie und aktuell Forschungsprofessor in der Neurologie Marburg, gilt ebenfalls mein Dank. Mit dem Team der Klinik für Neurologie hat er die Voraussetzung zur Durchführung dieser Dissertation überhaupt möglich gemacht.

Ganz besonders möchte ich mich bei dem Team des Neurobiologischen Labors der Klinik für Neurologie Marburg bedanken. Insbesondere Frau Christine Höft gilt mein herzlichster Dank. Durch sie wurde ich in alle Labortechniken eingewiesen und unterstützt. Bei vielen müßigen Nachmessungen und Datenkontrollen war sie die große Hilfe, die man als Neuling in einem Labor braucht.

Meiner Familie danke ich für moralische Unterstützung, immer wenn ich sie brauchte. Hier möchte ich besonders meinem Bruder Max, meinem Vater Klaus und meinem Schwiegervater Birger danken, die mir immer mit gutem Rat und Motivation zur Seite gestanden haben.

Diese Arbeit wäre jedoch trotz all dieser Hilfe nicht fertig geworden, wenn nicht meine geliebte Frau Lia mich zu jeder Zeit, ohne Pause und auch in den anstrengendsten Zeiten zu mir gehalten hätte. Ihre Unterstützung in allen Lebenslagen war der Schlüssel zu dieser Arbeit. Dafür kann ich Ihr nicht genug danken.

## 7.5 Ehrenwörtliche Erklärung

### Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Die Bedeutung des PLA2G6 Gens für Parkinson Patienten mit frühem Krankheitsbeginn“ in der Klinik für Neurologie unter Leitung von Prof. Dr. Jens Carsten Möller mit Unterstützung durch Christine Höft ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Ich versichere, dass ich sämtliche wörtlichen oder sinngemäßen Übernahmen und Zitate kenntlich gemacht habe. Mit dem Einsatz von Software zur Erkennung von Plagiaten bin ich einverstanden.

Diese Arbeit bzw. Teile davon sind bereits in folgenden Publikationsorganen bzw. auf folgenden Kongressen vorgestellt bzw. veröffentlicht worden:

- Kauther KM, Höft C, Rissling I, Oertel WH, Möller JC. Polymorphisms of the Phospholipase A2 gene in patients with young-onset Parkinson disease (YOPD). Posterpräsentation auf dem 6. Deutscher Parkinson Kongress in Marburg. 09/2009
- Kauther KM, Höft C, Rissling I, Oertel WH, Möller JC.  
The PLA2G6 gene in early-onset Parkinson's disease. Movement disorders: Official journal of the Movement Disorder Society. 2011;26(13):2415-7. Epub 2011/08/04.

Steinhagen, den 16.04.2020

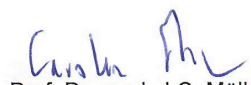


Kai Michael Kauther

---

Die Hinweise zur Erkennung von Plagiaten habe ich zur Kenntnis genommen.

Zihlschlacht, den 18.11.2019



Prof. Dr. med. J.C. Möller